

**UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DEN EINFLUSS DER SUPEROVULATION AUF
MORPHOLOGIE, KULTIVIERUNG UND
TIEFGEFRIERKONSERVIERUNG
VON EIZELLEN BEIM KANINCHEN**

Joachim Braun

—
1978
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552316_0086

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München
Lehrstuhl: Professor Dr. W. Leidl

UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DEN EINFLUSS DER SUPEROVULATION AUF
MORPHOLOGIE, KULTIVIERUNG UND TIEFGEFRIERKONSERVIERUNG
VON EIZELLEN BEIM KANINCHEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Joachim Braun
aus
Schwarzenfeld

München 1977

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Tiermedizin der Universität
München

Dekan:	Prof. Dr. H. Kräußlich
Referent:	Prof. Dr. W. Leidl
Korreferent:	Priv.-Doz. Dr. I. Rüsse

Tag der Promotion: 24. Februar 1978



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	4
2. LITERATUR	5
2.1. Begriffsbestimmung	5
2.2. Auswirkungen der Superovulation auf Eizellen in-vivo	6
2.2.1. Intrafollikuläre Reifung	6
2.2.2. Ovulation	7
2.2.2.1. Ovulationsrate	7
2.2.2.2. Wiederholte Superovulation	8
2.2.2.3. Fruchtbarkeit nach einer Superovulation	9
2.2.2.4. Ovulation unreifer Eizellen	9
2.2.3. Konzeption	10
2.2.4. Befruchtung	10
2.2.5. Polyspermie	11
2.2.6. Transport und Morphologie unbefruchteter Eizellen	12
2.2.7. Teilungsrate befruchteter Eizellen	12
2.2.8. Verteilung der prae- bzw. post- implantatorischen Verluste	13
2.2.9. Wurfgrößen nach Superovulation	14
2.3. Auswirkungen der Superovulation auf in-vitro Versuche mit Eizellen	15
2.3.1. In-vitro Reifung	16
2.3.2. In-vitro Fertilisation	16
2.3.3. Kultivierung befruchteter Eizellen	18
2.3.4. Tiefgefrierkonservierung befruchteter Eizellen	19
2.3.5. Transplantation befruchteter Eizellen	19

	Seite
2.4. Sonstige Auswirkungen der Superovulation	21
2.4.1. Spermakonservierung sowie Röntgen- bestrahlung von Sperma	21
2.4.2. Genitalsekrete	23
2.4.3. Hormonspiegel superovulierter Tiere	24
2.4.4. Chromosomale Aberrationen	25
2.4.5. Morphologie von Follikel bzw. Corpus luteum	26
2.4.6. Morphologie von Eizellen	26
2. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	27
3.1. Material und Methode	27
3.1.1. Versuchsaufbau	27
3.1.2. Versuchstiere - Haltung und Fütterung	28
3.1.2.1. Weibliche Tiere	28
3.1.2.2. Männliche Tiere	29
3.1.3. Hormonelle Ovulationsauslösung	29
3.1.3.1. Ovulation mit physiologischer Eizahl	29
3.1.3.2. Superovulation	29
3.1.4. Besamung	30
3.1.5. Eigewinnung	30
3.1.5.1. Zeitpunkt	30
3.1.5.2. Spülflüssigkeit	31
3.1.5.3. Spülung am getöteten Tier	31
3.1.5.4. Spülung am lebenden Tier	32
3.1.6. Mikroskopische Beurteilung der Eizellen	33
3.1.6.1. Beurteilung der Befruchtung	33
3.1.6.2. Morphologische Klassifizierung	33
3.1.7. In-vitro Kultivierung	34
3.1.8. Tiefgefrierkonservierung	35
3.1.9. Rücktransplantation tiefgefrorener Eizellen	39
3.1.9.1. Synchronisation des Rezipienten	39
3.1.9.2. Transplantation	40

	Seite
3.2. Ergebnisse	41
3.2.1. Statistische Auswertung (Überblick)	41
3.2.2. Ovulationsrate	48
3.2.3. Wiederfindungsrate	48
3.2.4. Befruchtungsrate	51
3.2.5. Morphologische Klassifizierung	52
3.2.6. In-vitro Kultivierung	54
3.2.7. Tiefgefrierkonservierung	61
4. DISKUSSION	63
5. ZUSAMMENFASSUNG	74
6. LITERATURVERZEICHNIS	80
LEBENS LAUF	94

1. EINLEITUNG

Die lange Zeit nur experimentell durchgeführte Eitransplantation bei Säugern soll jetzt als biotechnisches Verfahren in der praktischen Tierzucht Anwendung finden. Damit gewinnt die Diskussion um die Superovulation, die eine wesentliche Voraussetzung für einen derartigen Einsatz der Eitransplantation ist, neue Bedeutung.

Ein erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, einen Überblick über die bisherigen Untersuchungen zu geben und deren Ergebnisse zusammenhängend zu diskutieren. Zum zweiten sollten in der eigenen experimentellen Arbeit am Modell Kaninchen Probleme untersucht werden, die sich bei einem Einsatz der Superovulation in der Tierzucht ergeben. Im Vordergrund stand dabei die Beurteilung der morphologischen Beschaffenheit von superovulierten Eizellen im Vergleich zu Eizellen aus induzierter Ovulation und deren Bedeutung für das Entwicklungsvermögen in-vitro sowie die Eignung zur Tiefgefrierkonservierung.

2. LITERATUR

Die nachfolgende Literaturübersicht stellt eine Auswahl der einschlägigen Veröffentlichungen dar, um den Einfluß der Superovulation auf die jeweiligen biologischen Parameter an Hand einiger exemplarischer Arbeiten darzustellen und zu diskutieren.

Es wurden Untersuchungen bei den Spezies Maus, Ratte, Hamster, Kaninchen, Schaf, Ziege, Schwein und Rind berücksichtigt. Dabei dominieren an Zahl und Wichtigkeit Untersuchungen an der Maus bzw. am Kaninchen.

2.1. Begriffsbestimmung

Es gibt weder eine eindeutige Definition der Superovulation noch ein einheitliches Verfahren zur Auslösung einer Superovulation. Aus der Vielzahl von Faktoren, die Einfluß auf den Erfolg der Superovulation haben, seien hier die wichtigsten summarisch erwähnt: die Tierart selbst, bei der dieses Verfahren angewendet wird, Rasse bzw. Linie der betreffenden Spezies, Hormondosis, Hormonpräparat, Applikationszeit- und Dauer, Zyklusstand bei Applikationsbeginn sowie Alter des Tieres.

Um dieser Vielfalt gerecht zu werden, soll folgende allgemeine Begriffsbestimmung Anwendung finden: Die Erhöhung der physiologischen Ovulationsrate einer Spezies durch die Applikation gonadotroper Hormone wird als Superovulation bezeichnet.

Im Gegensatz dazu steht eine Ovulation mit physiologischer Eizahl, wie sie im Laufe eines Sexualzyklus spontan bei Maus, Ratte, Hamster, Schaf, Ziege, Schwein und Rind erfolgt oder beim Kaninchen durch den Deckakt provoziert wird. Auch die induzierte Ovulation, die beim Kaninchen mit LH oder HCG jederzeit ausgelöst werden kann, hat eine physiologische Eizahl zur Folge. Wegen der Einfachheit und Sicherheit dieses Verfahrens wird die induzierte Ovulation sehr häufig der provozier-ten Ovulation vorgezogen.

2.2. Auswirkungen der Superovulation auf Eizellen in-vivo

2.2.1. Intrafollikuläre Reifung

Bei den Säugetieren sistiert die Meiose in den Oocyten im peripartalen Zeitraum auf einer Zwischenstufe, dem Dictyotän der Prophase I (engl.: germinal vesicle). Erst mit Erreichen der Geschlechtsreife wird in jedem Zyklus bei einer speziesunterschiedlichen Zahl von Oocyten die Meiose fortgesetzt. Während dem LH eine Bedeutung für die Ingangsetzung dieser Vorgänge zugemessen wird, scheint das gleichzeitig erfolgende Follikelwachstum durch FSH stimuliert zu werden (SCHUETZ, 1974).

Die Frage, ob durch die Superovulation dieser Reifeprozess in seinem zeitlichen oder qualitativen Ablauf verändert wird, wurde bei folgenden Spezies untersucht und jeweils verneinend beantwortet:

Maus (EDWARDS und GATES, 1959); Ratte (ODOR, 1955); Schwein (SPALDING et al., 1955); Schaf (BERRY und SAVERY, 1958); Rind (HAFEZ und ISHIBASHI, 1964).

2.2.2. Ovulation

2.2.2.1. Ovulationsrate

Aus den schon in 2.1. erwähnten Gründen ist hinsichtlich der Höhe der Ovulationsrate eine große Variation der Ergebnisse zu erwarten. Eine eindeutige Festlegung, wie hoch die Ovulationsrate sein muß, um von einer Superovulation sprechen zu können, etwa im Sinne einer statistisch zu sichernden Signifikanz gegenüber unbehandelten Kontrolltieren, existiert in der wissenschaftlichen Literatur nicht.

Die nachstehend zitierten Ergebnisse sollen repräsentativ für die jeweiligen Spezies darstellen, welche Eizahlen bei der Superovulation im Vergleich zur natürlichen Ovulation erreicht werden können.

Maus	: Superovulation 39,5; Kontrollen 12,8 (BEAUMONT und SMITH, 1975)
Hamster	: Superovulation 33,8 bis 57,0; Kontrollen 9,2 bis 13,8 (MOORE und GREENWALD, 1974)
Kaninchen	: Superovulation 53,7; Kontrollen 10,1 (KENELLY und FOOTE, 1965)
Schwein	: Superovulation 24,6; Kontrollen 11,6 (WEBEL et al., 1975)
Rind	: Superovulation 22 (AVERY und GRAHAM, 1962)

2.2.2.2. Wiederholte Superovulation

FOWLER und EDWARDS (1957) beobachteten nach mehrmaliger Applikation von PMSG und HCG zur Auslösung einer Superovulation bei Mäusen, daß sich im Verlauf des Versuches weniger Tiere paarten, weniger ovulierten und weniger Tiere trächtig wurden. Nach wiederholter Superovulation war im folgenden natürlichen Zyklus zwar ein hoher Prozentsatz der Tiere paarungsbereit und hatte auch eine Ovulation, jedoch wurden nur wenige Tiere trächtig. LIN und BAILEY (1965) wiesen bei Mäusen einen vom Tierstamm abhängigen Grad einer Immunitätsentwicklung gegen PMSG-HCG nach, die sich durch eine sinkende Ovulationsrate mit zunehmender Anzahl von Superovulationen manifestierte.

Auch beim Kaninchen ist eine Verringerung der Ovulationsrate nach wiederholter Superovulation mit FSH-LH oder PMSG-HCG festzustellen (MAURER et al., 1968 a). Bei der Verwendung von PMSG-HCG zur Ovulationsauslösung nahm auch die Zahl der Tiere ab, die ovulierten. Die Autoren führen dies auf eine Antikörperbildung gegen HCG zurück. Wiederholte Superovulationen beim Rind hatten ebenfalls einen negativen Effekt auf die Höhe der Ovulationsraten (WILLETT et al., 1953; JAINUDEEN et al., 1966; SAUMANDE und CHUPIN, 1977).

2.2.2.3. Fruchtbarkeit nach einer Superovulation

Eine einmalige Superovulation hatte auf das Konzeptionsergebnis in den nachfolgenden natürlichen Zyklen bei Maus (EDWARDS und FOWLER, 1960), Schwein (DAY, 1965) und Rind (WILDT et al., 1975) keine negative Auswirkung.

2.2.2.4. Ovulation unreifer Eizellen

Im physiologischen Ablauf einer Ovulation werden bei der Maus und beim Schwein in der Regel nur Oocyten in der Metaphase II aus den Follikeln in den Eileiter entlassen. Bei diesen Spezies kann aber auch eine geringe Anzahl unreifer Stadien, meistens primäre Oocyten, zur Ovulation kommen. Dieser Anteil wird bei der Maus mit durchschnittlich 1,3 % angegeben (AUSTIN und BRADEN, 1954), beim Schwein mit 0,2 % (HANCOCK, 1961).

Bei superovulierten Eizellen der Maus fand sich nur 1 primäre Oocyte unter 2 700 untersuchten Eizellen (DONAHUE, 1972 b). Dagegen stellte HUNTER (1966) bei superovulierten Schweineeizellen einen Anteil von 8 % primären Oocyten fest. Dieser hohe Prozentsatz kommt vor allem durch sehr hohe Anteile an primären Oocyten bei Ovulationsraten über 45 zustande, darunter lagen die Anteile bei durchschnittlich 2 - 3 %.

DONAHUE (1972 b) erwähnt, daß im Laufe einer Superovulation bei der Maus die im zeitlichen Ablauf zuerst ovulierten Eizellen oft noch in der Telophase I oder Prometaphase II stehen, jedoch im Eileiter ihre Reifung vollenden.

2.2.3. Konzeption

Als Kriterium für eine Konzeption dient in der Regel das Vorhandensein von mindestens einer befruchteten Eizelle, unabhängig von der Zahl der ovulierten Eizellen.

Während FOWLER und EDWARDS (1957) bei Mäusen eine signifikant niedrigere Konzeptionsrate nach Superovulation im Vergleich zu hormonell unbehandelten Tieren fanden, lassen die Ergebnisse beim Kaninchen (KENELLY und FOOTE, 1965; BEATTY, 1958) und beim Schwein (HUNTER, 1966) diesen Schluß nicht zu. Beim Rind werden Konzeptionsraten nach Superovulation von 56 % (AVERY und GRAHAM, 1962), 50 % (McGAUCH et al., 1974) und 77% (SCANLON et al., 1968) angegeben. Bei den aufgeführten Untersuchungen war die Konzeption unabhängig von der Ovulationsrate.

2.2.4. Befruchtung

Die nachstehend angegebenen Befruchtungsraten geben den Anteil befruchteter Eizellen an den insgesamt aus dem weiblichen Genitaltrakt gewonnenen Eizellen an.

Von allen Autoren wird eine regelmäßige Teilung der Eizelle als Befruchtungskriterium verwendet. 93 % befruchtete Eizellen bei der Maus (FOWLER und EDWARDS, 1957),

91 % beim Kaninchen (KENELLY und FOOTE, 1965) und 84 % beim Schwein (HUNTER, 1966) nach Superovulation lassen keine signifikanten Abweichungen von nicht hormonell behandelten Tieren erkennen.

Beim Rind liegen besondere Verhältnisse vor, da bei einer spontanen Ovulation nicht von einer Befruchtungsrates im obigen Sinne gesprochen werden kann. Vielmehr ist dieser Vorgang ein "entweder - oder" Ereignis.

Nach Superovulation wurden Befruchtungsraten von 66 % (HAFEZ et al., 1963), 61 % (AVERY und GRAHAM, 1962) und 73 % (BETTERIDGE und MITCHELL, 1974) gefunden.

Angaben über eine Abhängigkeit der Befruchtungsrates von der Ovulationsrate finden sich bei keinem der Autoren.

2.2.5. Polyspermie

Das Eindringen von mindestens zwei Spermien in den Vitellus während des Befruchtungsvorganges wird Polyspermie genannt (AUSTIN, 1961). Bei der Maus wird die Häufigkeit dieses Vorganges nach spontaner Ovulation mit 0,8 % (BRADEN, 1957) und nach Superovulation mit 0,3 % (DONAHUE, 1972 a) angegeben.

Beim Schwein lauten die entsprechenden Zahlen 1,9 % nach Spontanovulation (AUSTIN, 1969) und 4 % nach Superovulation (HUNTER, 1966). Ebenfalls beim Schwein stellte HUNTER (1968) nach einer in der Lutealphase ausgelösten Superovulation (PMSG-Applikation am 6. Tag des Zyklus) eine Polyspermierates von 60 % fest. Wurden unbefruchtete Eizellen aus einer solchen Superovulation auf im Östrus

stehende, inseminierte Rezipienten übertragen, ging die Polyspermierate wieder zurück. Der Autor führt dieses Phänomen auf die durch die Progesterondominanz veränderten Genitalsekrete zurück.

2.2.6. Transport und Morphologie unbefruchteter Eizellen

Der Transport unbefruchteter Eizellen wurde, vergleichend Spontan- versus Superovulation, bei der Maus (McLAREN und ORSINI, 1968) und beim Kaninchen (LONGO, 1974) untersucht. In beiden Versuchen ergaben sich keine Unterschiede in der Transportgeschwindigkeit durch den Eileiter und in der Morphologie dieser Eizellen im Verlauf ihrer Wanderung. Keiner der Autoren beobachtete eine Fragmentation, d.h. den Zerfall des Vitellus in sogenannte "Pseudoblastomeren", die mit einer regelmäßig geteilten, befruchteten Eizelle zu verwechseln gewesen wäre.

2.2.7. Teilungsrate befruchteter Eizellen im weiblichen Genitale

Der Einfluß der Superovulation auf die Teilungsraten befruchteter Eizellen wurde bei Maus (ALLEN und McLAREN, 1971) und Kaninchen (VARIAN et al., 1967) untersucht. Bei der Maus wurde der Zeitabstand zwischen den Teilungen durch die Superovulation nicht verändert, jedoch wurden die superovulierten Eizellen, im Gegensatz zu Eizellen unbehandelter Kontrolltiere, immer 4 - 5 h früher im entsprechenden Entwicklungsstadium angetroffen. Die Autoren führen dies darauf zurück, daß die Ovulation bei superovulierten Tieren etwa um 24.00 Uhr ausgelöst wurde, die spontane Ovulation jedoch erst um 4.00 Uhr erfolgte.

Auch beim Kaninchen beeinflusste die Superovulation die Teilungsrate nicht, jedoch erreichten die superovulierten Eizellen das Zweizellstadium im Durchschnitt 2 - 4 h später. Dies wird mit einer längeren Ovulationsdauer bei der Superovulation erklärt.

Über das Rind liegen keine direkt vergleichenden Angaben vor. Ergebnisse verschiedener Autoren deuten jedoch darauf hin, daß auch hier die Teilungsrate durch die Superovulation nicht beeinflusst wird (SCANLON et al., 1968; HAMILTON und LAING, 1946).

2.2.8. Verteilung der prae- bzw. post- implantatorischen Verluste

Die hohe Zahl befruchteter Eizellen nach Superovulation (s. 2.2.4.) steht im Gegensatz zu den Wurfgrößen, die danach beobachtet wurden (s. 2.2.9.). Wie diese Verluste sich auf die einzelnen Phasen der Gravidität verteilen, untersuchten BEAUMONT und SMITH (1975) bei der Maus. Danach waren am 2. Tag post coitum (Abk.: p.c.) bei unbehandelten Kontrolltieren 87 % der gefundenen Eizellen normal entwickelt, bei superovulierten nur 66 %. Nähere Angaben über die verwendeten morphologischen Kriterien werden nicht gemacht. Am 4. Tag p.c. fiel die Rückgewinnungsrate bei den superovulierten Tieren auf 56 % (2. Tag p.c. 91 %), dafür wurden aber 83 % der Blastocysten als normal klassifiziert, d.h. die meisten der am 2. Tag als nicht normal bzw. degeneriert beurteilten Eizellen müssen auf irgendeine Weise eliminiert worden sein.

In beiden Gruppen implantierten nahezu alle der zu Blastocysten entwickelten Eizellen. Allerdings wurden am 12. Tag p.c. 40 % der Implantationsstellen bei den superovulierten Tieren als retardiert bzw. degeneriert klassifiziert. Die Zahl der normal entwickelten Implantationsstellen lag mit durchschnittlich 15 deutlich höher als in der Kontrollgruppe mit 8. Weitere Verluste bis zur Geburt wurden nicht mehr erfaßt. EDWARDS und FOWLER (1959) wiesen nach, daß bei superovulierten Mäusen der Fruchttod nach dem 11. Tag p.c. signifikant mit der Zahl der Implantationen stieg.

Bei unbehandelten Kaninchen betrugen die prae-implantatorischen Verluste nach ADAMS (1960) 9,7 % der ovulierten Eizellen, weitere 18 % starben nach der Implantation ab. Diese post-implantatorischen Verluste gliederten sich auf in 7 % kurz nach der Implantation, also am 7. und 8. Tag der Gestation, 65,8 % vom Tag 8 - 17 und 27,2 % vom Tag 17 - 23. Bei den superovulierten Kaninchen implantierten 50 % der ovulierten Eizellen, weitere 37 % starben im weiteren Verlauf der Gravidität ab, so daß am Ende der Gravidität nur etwa 13 % der ovulierten Eizellen sich zu lebenden Foeten entwickelt hatten. Dabei entsprach die zeitliche Verteilung der post-implantatorischen Verluste der der Kontrolltiere.

2.2.9. Wurfgrößen nach Superovulation

Die oben beschriebenen prae- und post-implantatorischen Verluste nach Superovulation führen in der Regel zu Wurfgrößen, die sich von denjenigen der Kontrolltiere nicht signifikant unterscheiden. Dies wurde nachgewiesen

bei der Maus (FOWLER und EDWARDS, 1957; McLAREN und MICHIE, 1959), beim Kaninchen (ADAMS, 1960; POLIDORO und BLACK, 1970) und beim Schwein (WEBEL et al., 1975). GREENWALD (1976) stellte bei superovulierten Hamstern mit einer durchschnittlichen Ovulationsrate von 46 und einer Befruchtungsrate von 90 % Wurfgrößen von 20,8 fest. Kontrolltiere wiesen dagegen 10,2 Jungtiere auf.

2.3. Auswirkungen der Superovulation auf in-vitro Versuche mit Eizellen

Grundlage jeder in-vitro Manipulation mit Eizellen, also ihre extrakorporale Reifung, Befruchtung, Kultivierung und Konservierung, ist eine genaue Kenntnis der metabolischen Vorgänge in der Eizelle. Diese sind systematisch bis jetzt nur bei der Maus untersucht worden, wobei vor allem die Kultivierung von Zweizellern zu Blastocysten als Versuchsobjekt gedient hat (BRINSTER, 1963). In weiteren Versuchen wurde der Einfluß von pH und Osmolarität (BRINSTER, 1965 a) verschiedener Energiesubstrate und deren Interaktionen (BRINSTER, 1965 b, 1965 d) sowie der Einfluß verschiedener Proteinquellen (BRINSTER, 1965 c; BRINSTER, 1968; BRINSTER und THOMSON, 1966) auf das Wachstum von Zwei- und Achtzellern in-vitro untersucht. Alle diese Arbeiten wurden mit superovulierten Eizellen durchgeführt.

WHITTEN und BIGGERS (1968) gelang mit einem modifizierten Medium nach BRINSTER die Kultivierung befruchteter Einzeller bis zur Blastocyste. Sie verwendeten **Mäuseeizellen** aus spontaner Ovulation. Dasselbe Medium diente HOPPE und PITTS (1973) für die in-vitro Befruchtung und Kultivierung spontan ovulierter Mäuseeizellen mit anschließender Rücktransplantation mit sehr gutem Erfolg.

2.3.1. In-vitro Reifung

Die in-vitro Reifung vom Dictyotän (Prophase I, engl.: germinal vesicle) zur Metaphase II vollzieht sich bei allen bisher untersuchten Säugetieren spontan, d.h. nach Entnahme aus dem Follikel und Überführung in ein Kulturmedium (SCHUETZ, 1974). Die endogenen bzw. exogenen zugeführten Gonadotropine, die eine in-vivo Reifung induzieren, scheinen demnach für die in-vitro Reifung nicht notwendig zu sein.

2.3.2. In-vitro Fertilisation

Bei der Verwendung tubaler unbefruchteter Eizellen für die in-vitro Fertilisation sind Einflüsse des tubalen und uterinen Milieus sowie der Faktor einer unphysiologisch hohen Eizahl auf die Entwicklung der Eizelle weitgehend ausgeschaltet.

NIWA und CHANG (1973) untersuchten die in-vitro Fertilisation tubaler Eizellen aus spontaner Ovulation adulter Ratten bzw. Superovulation immaturer Ratten. Es ergaben sich unterschiedliche Befruchtungsraten in Abhängigkeit von der Art der Ovulationsauslösung. Bei Spermakonzentrationen von $1,8 - 3,7 \times 10^6$ Sp./ml im Inkubationsmedium wurde keine der spontan ovulierten Eizellen befruchtet gegenüber 16 % bei den superovulierten Eizellen. Bei einer Spermakonzentration von $0,7 - 1,5 \times 10^6$ Sp./ml lauteten die entsprechenden Befruchtungsraten 2 - 8 % bei den spontan ovulierten und 96 % bei den superovulierten Eizellen. Die Autoren vermuten eine nicht näher erklärte andersartige Beschaffenheit der Zona pellucida superovulierter Eizellen als Ursache dieser Unterschiede.

MIYAMOTO und CHANG (1973) gelang dagegen sowohl bei spontan ovulierten als auch bei superovulierten Eizellen adulter Ratten keine in-vitro Fertilisation, wenn sie mit epididymalem, in-vitro kapazitiertem Sperma arbeiteten. Bei Verwendung von in-vivo kapazitiertem Sperma konnten sie keinen Unterschied zwischen den Befruchtungsraten beider Gruppen feststellen, wenn Sperma verwendet wurde, das 4 - 5 h nach einer Paarung aus dem Uterus gewonnen wurde. Bei einer Verlängerung dieser Zeitspanne auf 10 - 11 h sank die Befruchtungsrate bei den spontan ovulierten Eizellen weniger stark ab als bei superovulierten Eizellen.

Bei vergleichenden Untersuchungen an Kanincheneizellen konnten keine Unterschiede in der Befruchtungsrate zwischen Eizellen aus Superovulation (FSH/HCG) und induzierter Ovulation (HCG) festgestellt werden (HAHN et al., 1977). Wurden aber die in-vitro befruchteten Eizellen auf hormonell (HCG) synchronisierte Rezipienten übertragen, so ergaben sich interessante Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Am 12. Tag der Gravidität waren in der Gruppe FSH/HCG nur 28 % der transplantierten Eizellen als Implantationsstellen nachzuweisen gegenüber 39 % in der Gruppe HCG. Am 28. Tag der Gestation hatten sich in der Superovulationsgruppe 20 % der transplantierten Eizellen zu lebenden Foeten entwickelt, in der Gruppe mit induzierter Ovulation dagegen 33 %. Nur dieser Unterschied war statistisch zu sichern ($p < 0,05$). Die Autoren sind jedoch der Ansicht, daß dies schon in der Prae-Implantationsphase durch eine Reduzierung der Embryonenzahl in der Gruppe FSH/HCG vorgegeben war. Als Ursachen für diese prae-implantatorischen Verluste diskutieren sie die Möglichkeit genetischer Defekte.

Jedoch werden keine direkten Angaben über die Höhe der Ovulationsrate gemacht, sondern es wird nur eine im Durchschnitt pro Tier gefundene Zahl von 10,9 Eizellen genannt. Dies läßt auf eine Ovulationsrate nach Superovulation schließen, die weit unter den üblichen Ergebnissen liegt.

2.3.3. Kultivierung befruchteter Eizellen

Die Entwicklung der in-vitro Kultivierung befruchteter Eizellen zur Standardmethode wurde bei der Maus durchwegs mit superovulierten Eizellen durchgeführt (BRINSTER, 1963). Auch die Kultivierung von Kanincheneizellen ist an superovulierten Eizellen erarbeitet worden (ONUMA et al., 1968; KANE und FOOTE, 1970).

Vergleichende Untersuchungen wurden bei der Maus von SPINDLE und GOLDSTEIN (1975) durchgeführt. Sie kultivierten Zweizeller aus spontaner Ovulation bzw. Superovulation bis zur Blastocyste und fanden keinen Unterschied in der Entwicklungsfähigkeit beider Gruppen. ROTTMANN und STRANZINGER (1977) gewannen befruchtete Kanincheneizellen im Einzellstadium 20 h post HCG (induzierte Ovulation) bzw. FSH/HCG oder PMSG/HCG (Superovulation). Während sich Eizellen aus induzierter Ovulation zu 86,3 % zu Zweizellern weiterentwickelten, war dies bei superovulierten Eizellen nur in 66 % ($p < 0,01$) der Fall. Als Gründe dafür werden eine andersartige Beschaffenheit der Eizelle bzw. ihrer Zona pellucida diskutiert. Die Autoren sind der Ansicht, daß durch das schnelle Wachstum einer großen Anzahl gleichzeitig reifender Oocyten bestimmte Grundstoffe nicht in ausreichender Menge verfügbar sind.

2.3.4. Tiefgefrierkonservierung befruchteter Eizellen

Seit der ersten gelungenen Konservierung befruchteter Mäuseeizellen bei -79°C (WHITTINGHAM, 1971) sind große Anstrengungen auf diesem Gebiet unternommen worden, die auch sehr schnell bei anderen Spezies zu Erfolgen führten. So gelang die Konservierung befruchteter Eizellen beim Kaninchen (BANK und MAURER, 1974), bei der Ratte (WHITTINGHAM, 1975), beim Schaf (WILLADSEN et al., 1976), bei der Ziege (BILTON und MOORE, 1976) und beim Rind (WILMUT und ROWSON, 1973), wobei alle diese Autoren mit einer Lagerungstemperatur von -196°C (flüssiger Stickstoff) arbeiteten. Ein Großteil dieser Versuche wurde ebenfalls mit superovulierten Eizellen durchgeführt, jedoch wurden spezifische Auswirkungen der Superovulation auf die Ergebnisse der Tiefgefrierkonservierung nicht untersucht.

2.3.5. Transplantation befruchteter Eizellen

Da es eine intrauterine Überwanderung von Embryonen bzw. Foeten beim Kaninchen nicht gibt (BOYD et al., 1944), ist es mit Hilfe der Eitransplantation möglich, in einem Uterushorn einen Zustand des "Overcrowding" herzustellen, ähnlich wie bei superovulierten Tieren. Das andere Horn kann dann als "Kontrollhorn" mit physiologischer Eizahl angesehen werden. Dadurch bekommt man zwei verschiedenartige Embryogruppen in einem Tier, die jedoch dem gleichen uterinen und hormonalen Milieu unterworfen sind.

Mit dieser Methode hat ADAMS (1962) versucht zu klären, ob systemische oder lokale Faktoren für die Embryonalsterblichkeit im "überfüllten" (engl.: crowded) Genitale des Kaninchens verantwortlich sind. Er transplantierte dazu superovulierte Eizellen (Gewinnung 72 h p.c.) auf synchronisierte Rezipienten und zwar in ein Uterushorn jeweils 5 Eizellen und variierte die Anzahl der transplantierten Eizellen im anderen Horn von 5 bis maximal 30. Es zeigte sich, daß die Zahl der Implantationsstellen proportional zur Anzahl übertragener Eizellen stieg, jedoch ab ca. 14 Implantationen nicht mehr zunahm. Der Anteil lebender Foeten im Kontrollhorn blieb unbeeinflusst von der Zahl der in das andere Horn transplantierten Eizellen. In den Fällen, in denen nach der Implantation alle Foeten eines Rezipienten abstarben, war keine Beziehung zur Anzahl der Implantationsstellen abzuleiten. Ebenso war der Anteil trächtiger Rezipienten, gemessen am Erfolg der Implantation, nicht abhängig von der Zahl übertragener Eizellen und unterschied sich auch nicht von der von Kontrolltieren mit induzierter Ovulation. Schließlich zeigte sich in der Post-Implantationsphase eine ähnliche Verteilung der Embryonalsterblichkeit mit gehäuften Verlusten vom 10. - 17. Tag der Gestation, wie sie ADAMS (1960) bei unbehandelten Kaninchen nachgewiesen hatte (s. 2.2.8.).

Auch MAURER et al. (1968 b) untersuchten die Entwicklungsfähigkeit superovulierter Kanincheneizellen nach Transplantation. Als Kontrolle dienten Eizellen aus induzierter Ovulation. Sie transplantierten einheitlich 8 - 9 Zweizeller auf einen Rezipienten und konnten keinen Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen, gemessen an der Anzahl lebender Jungen, feststellen.

Bei diesen Versuchen wiesen die Rezipienten infolge der induzierten Ovulation eine physiologische Zahl von Corpora lutea auf. HAFEZ (1964) untersuchte dagegen, ob die Superovulation des Rezipienten im Gegensatz zur induzierten Ovulation Einflüsse auf die Parameter Trächtigkeitsrate bzw. Implantationsrate zeigt. Superovulierte Rezipienten wurden demzufolge weniger oft trächtig, hatten im Durchschnitt weniger Implantationen und geringere Wurfgrößen. Bei Eitransplantationsversuchen am Schaf hatte dagegen die Superovulation des Rezipienten keinen Einfluß auf die Entwicklungsfähigkeit der transplantierten Eizellen (MOORE und ROWSON, 1960).

2.4. Sonstige Auswirkungen der Superovulation

2.4.1. Spermakonservierung sowie Röntgenbestrahlung von Sperma

GÖTZE (1973) untersuchte den Einfluß einer in-vitro Röntgenbestrahlung des zur Besamung bestimmten Spermas auf die prae-implantatorische Entwicklung beim Kaninchen. Als Kriterien verwendete er eine morphologische Beurteilung der Eizellen 45 h post HCG sowie der Blastocysten am 6. Tag post HCG.

Wurde mit Sperma besamt, das vorher mit 1 000 rad bestrahlt worden war, wurden nur 50 % der Eizellen von superovulierten Tieren (FSH/HCG) als normal klassifiziert, gegenüber 87,3 % bei Tieren mit induzierter Ovulation (HCG). Die Vergleichswerte für unbehandeltes Sperma lauteten 78,5 % (FSH/HCG) und 88 % (HCG). Wurde nur mit 500 rad bestrahlt, war dieser Einfluß bei den frühen Stadien nicht mehr nach-

weisbar, jedoch lag der Prozentsatz normal entwickelter Blastocysten bei den superovulierten Tieren mit 14,2 % bedeutend niedriger als bei Kontrolltieren mit 42,4 %. Die Vergleichswerte für unbehandeltes Sperma waren hier 66,4 % (FSH/HCG) und 69 % (HCG).

Bei einer Bestrahlung mit 250 rad hatte die Art der Ovulationsauslösung keinen Einfluß mehr auf die untersuchten Parameter. Dagegen war dieser Einfluß wieder erkennbar, wenn die Auswirkungen von Sperma untersucht wurden, das entweder frisch oder tiefgefroren bestrahlt und dann zur Insemination verwendet wurde. Während bei Tieren mit induzierter Ovulation dieses unterschiedliche Verfahren keinen Einfluß auf die prae-implantatorische Entwicklung hatte, sank bei superovulierten Tieren der Anteil normaler Eizellen von 82,9 % auf 63,4 %, wenn statt Frischsperma Tiefgefriersperma verwendet wurde.

Definierte Kriterien für die morphologische Beurteilung der Eizellen bzw. Blastocysten wurden nicht angegeben. Unbefruchtete und degenerierte Eizellen bzw. Blastocysten subsumierten die Autoren unter den Begriff "nicht normal".

Mit einer ähnlichen Versuchsanordnung arbeiteten GÖTZE und PAUFLER (1976), um den Einfluß der Samenkonservierung bei Kaninchen mit induzierter Ovulation oder Superovulation zu untersuchen.

Während bei Tieren mit induzierter Ovulation der Einsatz von Tiefgefriersperma gegenüber flüssig konserviertem Sperma keinen Einfluß auf den Anteil "normaler" Entwicklungsstadien hatte, war bei superovulierten Tieren ein statistisch zu sichernder Rückgang des Anteils normaler Blastocysten nach Einsatz von Tiefgefriersperma festzustellen. Auch hier werden keine Angaben über die verwendeten morphologischen Kriterien gemacht.

Der Einfluß der Lagerungszeit von flüssig oder tiefgefroren konserviertem Sperma auf die Embryonalentwicklung beim Kaninchen wurde von MAURER et al. (1976) untersucht. Das Blastocystenvolumen bei superovulierten Tieren war signifikant kleiner als bei Kontrolltieren, wenn zur Besamung Sperma verwendet wurde, das 5 h bei 37°C, 5°C oder - 196°C bzw. 1 Jahr bei - 196°C gelagert worden war. Sperma, das 5 Tage bei 5°C oder - 196°C gelagert worden war, bewirkte ein etwa gleich großes Blastocystenvolumen bei induziert- und superovulierten Tieren.

2.4.2. Genitalsekrete

Die Zusammensetzung der Eileiter- und Uterussekrete hinsichtlich ihres Gehaltes an Elektrolyten, Kohlehydraten, Proteinen und Enzymen sowie ihr Volumen ist bei allen bisher untersuchten Spezies zyklusabhängig bzw. abhängig vom Graviditätsstadium (HAMNER, 1971).

Die Auswirkungen der Superovulation auf die Genitalsekrete wurden bisher nur beim Schaf untersucht (PERKINS und GOODE, 1966 und 1967). Danach hatte eine Synchronisation mit Gestagenen mit anschließender Applikation von 650 IE PMSG keinen Einfluß auf die Zusammensetzung des Eileitersekretes. Untersucht wurden Aminosäuren, Proteine, Milchsäure und alkalische Phosphatase. Allerdings verschob sich der Zeitpunkt des Maximalvolumens der Genitalsekrete vom ersten bis zweiten Tag nach Beginn des Östrus auf den dritten bis vierten Tag. Die Höhe des Maximalvolumens blieb unverändert.

2.4.3. Hormonspiegel superovulierter Tiere

Es liegt nahe anzunehmen, daß der komplizierte hormonelle Regelkreis, der das zyklische Geschehen an den Ovarien bzw. die einzelnen Phasen der Gravidität steuert, durch die massive Applikation exogener Gonadotropine beeinflusst wird. Trotzdem gibt es von den verschiedenen Spezies, bei denen die Superovulation praktiziert wird, nur wenige Informationen darüber.

Bei den Haustieren Rind (HENRICKS et al., 1973) und Schwein (GUTHRIE et al., 1974) sind die Plasma-Östrogenkonzentrationen während des durch die Superovulation ausgelösten Östrus mit der Höhe der PMSG-Dosis korreliert. Sie steigen bei superovulierten Tieren schneller auf höhere Werte und fallen später und langsamer ab. Darüber hinaus wird bei beiden Spezies der LH-Peak durch die Superovulation vorverlegt. Die Plasma-Progesteronspiegel der superovulierten Kühe fallen erst kurz, aber sehr abrupt, vor dem Östrus ab. Damit kommt es bei diesen Tieren zu einer längeren Phase von hohem Östrogen- und Progesteronspiegel. Beim Schwein wurde darüber hinaus der Zeitraum der Frühgravidität bis zum 24. Tag post conceptionem untersucht. Die Plasma-Progesteronwerte der superovulierten Tiere lagen jeweils signifikant über denen von unbehandelten Kontrolltieren. Vergleichbare Werte für die Gravidität beim Schwein haben auch WEBEL et al. (1975) gefunden. Dagegen waren die Progesteronwerte in der Spätgravidität zwischen spontan- und superovulierten Tieren nicht verschieden.

Superovulierte Kaninchen hatten vom 10. bis zum 30. Tag der Gravidität Plasma-Progesteronspiegel, die denen von natürlich gedeckten Tieren entsprachen (POLIDORO und BLACK, 1970). Dagegen wiesen superovulierte Hamster während der gesamten Trächtigkeitsdauer Progesteronkon-

zentrationen auf, die zwei- bis viermal höher als bei Kontrolltieren lagen. Die Konzentration von 17- β -Ostradiol war durch die Superovulation nicht beeinflusst, jedoch war der Abfall kurz vor der Geburt sehr viel schwächer als bei Kontrolltieren. LH- und FSH-Konzentration wurden durch die Superovulation nicht verändert.

2.4.4. Chromosomale Aberrationen

Der Nachweis chromosomaler Aberrationen an Eizellen stößt auf die Schwierigkeit, daß erst bei einer höheren Zellzahl mit einer gewissen Sicherheit auswertbare Metaphasen darstellbar sind. PAUFLER et al. (1975) verwendeten deshalb für ihre Chromosomenstrukturanalysen 6 Tage alte Kaninchenblastocysten. Die Autoren fanden eine signifikante Verkürzung in der relativen Gesamtlänge der Chromosomen und eine Veränderung des Armlängenverhältnisses in superovulierten Blastocysten. Mit dem selben Untersuchungsobjekt arbeiteten auch FUJIMOTO et al. (1974). Während sie in Blastocysten aus provozierter Ovulation keine chromosomalen Aberrationen entdecken konnten, fanden sie in 7 von 72 superovulierten Blastocysten chromosomale Defekte wie Triploidie, Mosaikbildung, Trisomie und Monosomie.

Bei Mäusen wurde nach Superovulation eine erhöhte Rate kongenitaler Mißbildungen festgestellt. Es traten vor allem Mißbildungen der Vorderpfoten wie Oligo- und Polydactylie auf, in weit geringerem Maße Mißbildungen des zentralen Nervensystems (Spina bifida, Exencephalus). In den Gruppen, in denen Mißbildungen beobachtet wurden, war das Geschlechtsverhältnis unter den geborenen Jungtieren signifikant zugunsten der weiblichen Tiere ver-

schohen (männl.: weibl. = 1 : 1,8 bzw. 1 : 2). Außerdem bestand eine positive Korrelation zwischen Hormondosis und Mißbildungsrate. Letzteres war zudem noch von der Jahreszeit abhängig. Bei Superovulation mit 5 IE PMSG + 5 IE HCG traten Mißbildungen nur im Frühjahr auf, jedoch nicht im Herbst (ELBLING, 1975).

2.4.5. Morphologie von Follikel bzw. Corpus luteum

MERK et al. (1973) untersuchten die Ultrastruktur der Granulosazellen in Follikeln von unbehandelten adulten Ratten und mit PMSG/HCG superovulierten immaturen Ratten mit Hilfe des Elektronenmikroskopes. Sie konnten keine morphologischen Unterschiede zwischen beiden Gruppen entdecken. Auch die Ultrastruktur des Corpus luteum beim Schaf nach Superovulation weicht nicht von den Verhältnissen nach einer Spontanovulation ab. Allerdings waren ab dem 4. Tag nach dem Östrus bei superovulierten Tieren in den Corpora lutea höhere Bindegewebsanteile zu beobachten (McCLELLAN et al., 1975).

2.4.6. Morphologie von Eizellen

Die Frage, ob die Superovulation Veränderungen in der Ultrastruktur der Eizelle auslöst, wurde bisher nur einmal untersucht. An unbefruchteten tubalen Kanincheneizellen aus provozierter Ovulation, induzierter Ovulation und Superovulation konnten keine Unterschiede beobachtet werden (LONGO, 1974). Interessant ist, daß bereits 4 h nach der Ovulation Desintegrationserscheinungen an der Chromosomenstruktur der Oocyten auftraten.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material und Methode

3.1.1. Versuchsaufbau

Für die Untersuchungen über den Einfluß der Superovulation auf Morphologie und Kultivierung von Eizellen beim Kaninchen wurden Eizellen dreier verschiedener Entwicklungsstadien verwendet: Zwei- bis Vierzeller, frühe Morula und späte Morula. In jedem dieser 3 Stadien wurden die Eizellen von jeweils 7 Tieren mit induzierter Ovulation und 7 Tieren mit Superovulation untersucht.

Entwicklungs- stadium	Superovulation Anzahl Tiere	induz. Ovulation Anzahl Tiere
Zwei- bis Vierzeller	7	7
frühe Morula	7	7
späte Morula	7	7
Gesamt	21	21

An jedem Tier wurden folgende Parameter bestimmt: Ovulationsrate, Wiederfindungsrate, Befruchtungsrate, Morphologie der Eizellen und Ergebnis der in-vitro Kultivierung (Tab. 1, 2, 3, 4, 5 und 6).

Für die Tiefgefrierkonservierung wurden 70 Eizellen (späte Morula) verwendet, die zu gleichen Teilen von je 5 Tieren mit induzierter Ovulation bzw. Superovulation stammten.

3.1.2. Versuchstiere - Haltung und Fütterung

Alle Versuche wurden mit Kaninchen der Rasse "Weiße Neuseeländer" durchgeführt.

3.1.2.1. Weibliche Tiere

Für die Gewinnung befruchteter Eizellen wurden nullipare Tiere verwendet, die mindestens 5 Monate alt und 3 kg schwer waren.

Die Kaninchen wurden in Einzeldrahtkäfigen auf Gitterrosten gehalten. Bei Versuchsbeginn war jedes Tier wenigstens 3 Wochen aufgestellt, um eine Scheinträchtigkeit ausschließen zu können. Die Käfige standen in einem fensterlosen Raum mit Zwangsbelüftung. Die Raumtemperatur konnte unabhängig von der Außentemperatur geregelt werden und betrug konstant 20°C, dagegen war die Luftfeuchtigkeit von der der Außenluft abhängig. Die Lichtphase dauerte von 6.00 - 18.00 Uhr.

Die Fütterung erfolgte mit einem Zuchtkaninchenalleinfutter (16 % Rohprotein), täglich 120 g. Wasser konnte ad libitum aufgenommen werden.

3.1.2.2. Männliche Tiere

Während der gesamten Versuchsperiode standen 4 geschlechtsreife Rammler zur Verfügung. Die Rammler waren in Einzelkäfigen in einem nichtklimatisierten Raum mit Tageslicht untergebracht. Fütterung und Tränke entsprachen den Gegebenheiten der weiblichen Tiere.

3.1.3. Hormonelle Ovulationsauslösung

3.1.3.1. Ovulation mit physiologischer Eizahl

Für die Ovulationsauslösung wurde Primogonyl^R (Schering AG, Berlin), ein Humanes Choriongonadotropin, in physiologischer Kochsalzlösung so gelöst, daß eine Konzentration von 120 IE/ml gegeben war. Die Applikation erfolgte intravenös in die Ohrtrandvene, die Dosierung betrug 20 IE/kg KGW.

3.1.3.2. Superovulation

Die Auslösung der Superovulation erfolgte mit FSH und LH (Schafhypophysenextrakte; Armour Baldwin Laboratories, USA). FSH wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und 6 x im Abstand von 12 h subcutan appliziert. Die Dosis pro Injektion betrug 0,3 mg FSH. 15 h nach der letzten FSH-Injektion wurden pro Tier einheitlich 2,5 mg LH, gelöst in 0,5 ml physiologischer NaCl, in die Ohrtrandvene appliziert.

3.1.4. Besamung

Das zur Besamung verwendete Sperma wurde mit Hilfe einer künstlichen Scheide gewonnen. Die so erhaltenen Ejakulate wurden subjektiv mikroskopisch untersucht; es wurden nur Ejakulate verwendet, die die Mindestanforderungen von 50 % Vorwärtsbeweglichkeit und einer Dichte von $10^5/\text{mm}^3$ erfüllten. Diese Ejakulate wurden gemischt und unverdünnt sofort zur Besamung verwendet. Es wurden jeweils 0,5 ml Mischsperma praecervical deponiert, so daß eine Mindestinseminationsdosis von 20×10^6 motiler Spermien gewährleistet war. Die Besamung erfolgte unmittelbar nach der HCG- bzw. LH-Injektion.

3.1.5. Eigewinnung

3.1.5.1. Zeitpunkt

Zur Gewinnung verschiedener Entwicklungsstadien befruchteter Eizellen wurde die Eigewinnung zu folgenden Zeiten durchgeführt:

Stadium I - Zwei- bis Vierzeller:
28 - 30 h post HCG- bzw. LH-Applikation

Stadium II - frühe Morula:
46 - 48 h post HCG- bzw. LH-Applikation

Stadium III - späte Morula:
66 - 68 h post HCG- bzw. LH-Applikation

3.1.5.2. Spülflüssigkeit

Als Spül- und Kulturmedium diente Ham-F 10 (Gibco Biocult, Karlsruhe), dem 1,5 % Bovines Serumalbumin (Serva, Heidelberg) sowie 100 IE/ml Penicillin und 50 µg/ml Dihydrostreptomycinsulfat zugesetzt wurde.

Das so angefertigte Medium wurde mit einer Atmosphäre Überdruck durch keimfreie Zellulosenitratfilter (Sartorius) gepreßt und in autoklavierten Flaschen mit Durchstechstopfen aufgefangen. Als Treibgas diente Stickstoff. Bis zum Gebrauch wurde das Medium im Kühlschrank gelagert.

Der pH-Wert des Mediums lag bei 7,2, die Osmolarität betrug 310 mosm.

3.1.5.3. Spülung am getöteten Tier

Die Tiere wurden mit einem kräftigen Schlag auf den Hinterkopf betäubt und durch eine Durchtrennung des Halses entblutet. Die Entblutung verhinderte zuverlässig eine Beimischung von Blut zur Spülflüssigkeit. Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurde jeweils ein Eileiter durch einen Scherenschlag kaudal der uterotubalen Verbindung vom dazugehörigen Uterushorn getrennt und zusammen mit Ovar und Adnexe aus dem Abdomen gelöst. Ohne eine weitere Freipräparierung des Eileiters wurde dieser sofort vom Fimbrientrichter her mit 3 ml körperwarmem Medium durchspült. Die Spülflüssigkeit beider Eileiter wurde in einem Zellkulturröhrchen aus Glas (16 x 85 mm) aufgefangen.

Zur Spülung der Uteri wurde das Mesometrium durchtrennt und das Uterushorn kranial der Cervix abgesetzt. Pro Uterushorn wurde 4,0 ml Spülflüssigkeit verwendet. Die Spülflüssigkeiten beider Hörner wurden ebenfalls in einem Kulturröhrchen aufgefangen. Die Zahl der Corpora lutea auf beiden Ovarien wurde festgehalten.

3.1.5.4. Spülung am lebenden Tier

Die Spülung in-vivo wurde durchgeführt, wenn alle Eizellen noch im Eileiter zu erwarten waren. Dies war sicher nur der Fall, wenn die Gewinnung der Eizellen 28 - 30 h oder 46 - 48 h post LH bzw. HCG erfolgte.

Die Narkose erfolgte mit Narcoren^R (Rentschler), das im Verhältnis 1 : 1 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt worden war. Bei einer Richtzahl von 40 mg/kg zur Erreichung eines Toleranzstadiums wurden 80 mg im Sturz intravenös appliziert, der Rest nach Wirkung. Danach wurden beide Flanken rasiert und desinfiziert.

Der Flankenschnitt erfolgte in der Mitte zwischen letzter Rippe und Hüfthöcker in einer Länge von ca. 3 cm. Die Vorverlagerung des Eileiters mitsamt dem Ovar war danach ohne weiteres möglich. Nun wurde ein dünner Kunststoffschlauch in den Fimbrientrichter etwa 2 cm eingeführt und zwischen Daumen und Zeigefinger fixiert. Mittels einer Knopfkanüle, die knapp kaudal der uterotubalen Verbindung in den Uterus eingestochen und von hier aus in den Eileiter eingeführt wurde, erfolgte die Spülung mit 3 ml Spülmedium in ein Kulturröhrchen. Nach Verschuß der Flanke in 3 Schichten wurde dasselbe Verfahren an der anderen Seite durchgeführt. Auch bei dieser Methode wurde die Zahl der Corpora lutea festgehalten.

3.1.6. Mikroskopische Beurteilung der Eizellen

Unmittelbar nach der Spülung wurden die Kulturröhrchen in Plastik-Petrischalen ausgekippt und alle darin befindlichen Eizellen unter mikroskopischer Kontrolle zweimal in frisches Medium umgesetzt. Dies geschah mittels einer silikonisierten und sterilisierten Glaskapillare, die mit einem Gummiverbindungsstück an einer Einmal-1 ml-Spritze befestigt war.

Zur Beurteilung wurden die Eizellen in einem Umkehrmikroskop "Diavert" (Leitz, Wetzlar) unter einer maximal 400-fachen Gesamtvergrößerung betrachtet.

3.1.6.1. Beurteilung der Befruchtung

Nichtgeteilte Eizellen wurden als unbefruchtet angesehen. Bei unregelmäßig geteilten Eizellen wurde das Vorhandensein von Spermien in der Zona pellucida als Voraussetzung für eine Befruchtung angenommen.

3.1.6.2. Morphologische Klassifizierung

Die befruchteten Eizellen wurden nach folgenden Kriterien klassifiziert:

Klasse A: Dem erwarteten Entwicklungsstand entsprechende Blastomerenzahl
Blastomeren gleichmäßig groß mit klarer Begrenzung
Gleichmäßig runde Form der Eizelle

Klasse B: Dem erwarteten Entwicklungsstand entsprechende Blastomerenzahl
Blastomeren mit unscharfen Begrenzungen oder unregelmäßiger Größe

Klasse C: Blastomerenzahl deutlich geringer als in Klasse A
Blastomeren gleichmäßig groß mit klarer Begrenzung
Gleichmäßig runde Form der Eizelle

Klasse D: Blastomerenzahl deutlich geringer als in Klasse A
Blastomeren ungleich groß ohne klare Begrenzung.

3.1.7. In-vitro Kultivierung

Für die in-vitro Kultivierung der gewonnenen Eizellen wurde das in 3.1.5.2. beschriebene Kulturmedium verwendet. Dazu wurden 2 ml des Kulturmediums in ein steriles, silikonisiertes Kulturröhrchen gegeben und die Eizellen in das Röhrchen übertragen. Das Röhrchen wurde mit einem autoklavierten Silikonstopfen verschlossen und liegend in einem Brutschrank bei 37,5°C aufbewahrt.

Bei dieser Methode stieg das pH des Mediums im Laufe von 24 h von 7,2 auf 7,6, so daß die Eizellen jeden Tag in ein Röhrchen mit frischem Medium umgesetzt werden mußten.

Die Kultivierungsdauer betrug für die Zwei- bis Vierzeller 96 h, für frühe Morula 72 h und für späte Morula 48 h.

Als Kriterium für eine erfolgreiche Kultivierung diene das Stadium der expandierten Blastocyste.

3.1.8. Tiefgefrierkonservierung

Die Versuche zur Tiefgefrierkonservierung wurden mit späten Morula, 66 - 68 h post HCG bzw. LH gewonnen, durchgeführt. Verwendet wurden nur Eizellen der Klasse A (siehe 3.1.6.2.). Die wichtigsten Parameter des Einfrier- und Auftauvorganges wie Kühl- und Auftaurate, Konzentration der Gefrierschutzsubstanz Dimethylsulfoxid (DMSO), DMSO-Zugabe und Rückverdünnung wurden von TSUNODA und SUGIE (1977) übernommen. Es wurden jeweils in einem Einfriervorgang eine gleiche Anzahl von Eizellen aus induzierter Ovulation und Superovulation eingefroren.

Die dafür vorgesehenen Eizellen wurden zuerst in ein Petrischälchen mit PBS (Dulbecco's phosphate-buffered-salt solution; KUHN, 1974) umgesetzt und von hier aus in einer Glaskapillare mit einer möglichst geringen Menge Medium in ein Kunststoffröhrchen aus Polypropylen (12 x 75 mm) übertragen. Dieses enthielt bereits 0,1 ml körperwarmes PBS und befand sich in einem Wasserbad gleicher Temperatur.

Als Gefrierschutzmittel wurde Dimethylsulfoxid verwendet. Dafür wurde eine 2,5 molare Lösung von DMSO in PBS hergestellt und ebenfalls auf 37,5° erwärmt. Von dieser

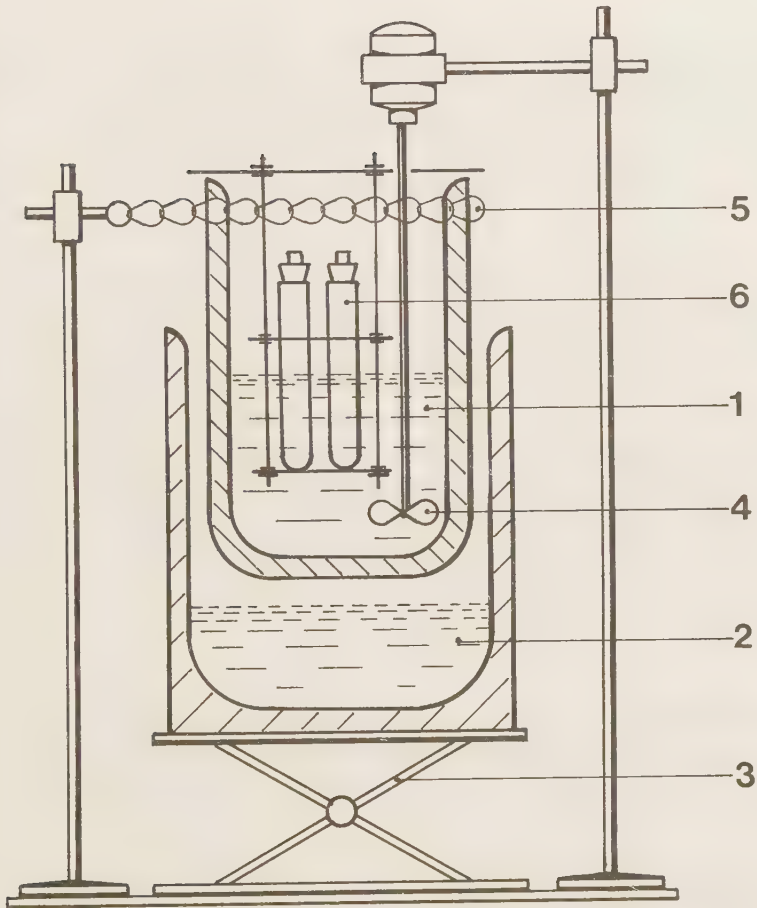


Abb. 1: Aufbau der Tiefgefriereinheit

- 1 96 %iger Alkohol
- 2 Flüssiger Stickstoff
- 3 Hebebühne
- 4 Rührwerk
- 5 Kettenklemme
- 6 Gestell mit Röhren

DMSO-Lösung wurden nun 3 x im Abstand von 10 Minuten 0,05 ml in das Röhrchen mit den Eizellen gegeben und das Röhrchen jeweils danach leicht geschüttelt, um die Equilibrierung zu erleichtern. Die Endkonzentration von DMSO im Gefriermedium war 1,5-molar.

Nach der 3. Zugabe von DMSO blieben die Versuchsröhrchen mit den Eizellen weitere 15 Minuten im Wasserbad. Danach wurden die Röhrchen mit einem Korken verschlossen, in den ein dünnes Glasröhrchen eingelassen war. Ein weiteres Plastikröhrchen wurde ebenfalls mit 0,25 ml 1,5-molarer DMSO-Lösung in PBS beschickt. Ein Thermofühler wurde so in dem Röhrchen placiert, daß dessen Spitze in das Medium eintauchte. Dieses Kontrollröhrchen wurde ebenfalls verkorkt. Der Thermofühler war mit einem Thermoschreiber (Varian, Darmstadt) verbunden, der einen Meßbereich von + 50°C bis - 200°C hat.

Die Einfrierapparatur ist in Abb. 1 dargestellt. Ein nicht-evakuiertes, unversilbertes Glasdewargefäß, das 500 ml 96 %igen Alkohol enthält, wird mittels einer Kettenklemme an einem Stativ befestigt. Darunter steht auf einer Hebebühne ein zweites Thermosgefäß mit größerem Durchmesser, das flüssigen Stickstoff enthält. Durch Heben und Senken der Hebebühne kann die Eintauchtiefe des Innengefäßes in das Außengefäß kontinuierlich variiert werden und somit die Abkühlgeschwindigkeit des Alkohols gesteuert werden. Ein Rührwerk im Alkoholbad, das während des gesamten Einfriervorganges eingeschaltet ist, bewirkt eine gleichmäßige Temperaturverteilung an allen Stellen.

Das Gestell mit den beiden Versuchsröhrchen und dem Kontrollröhrchen wurde nun in das Alkoholbad, das Zimmertemperatur hatte, eingehängt und gleichzeitig wurde das Rührwerk eingeschaltet. Mit Hilfe der Höhenverstellung des Außengefäßes konnte eine Abkühlrate von $1^{\circ}\text{C}/\text{Minute}$ ohne Schwierigkeiten eingestellt werden. Bei -5°C wurde das Außengefäß vorübergehend abgesenkt, um eine weitere Abkühlung während der Kristallisation zu vermeiden. Die Kristallisation wurde mit einer feinausgezogenen Glaspipette ausgelöst, die kurze Zeit in flüssigem Stickstoff gekühlt und dann unter Sichtkontrolle in das Gefriermedium der Röhrchen eingeführt wurde. Der Eintritt der Kristallisation ließ sich am Thermoschreiber durch einen Temperatursprung von 1°C bis 2°C nach oben ablesen. Während der Phase des Eiswachstums in den nächsten 3 - 4 Minuten fiel die Temperatur in den Röhrchen wieder auf -5°C . Jetzt wurde das Außengefäß so weit hochgestellt, daß erneut eine Abkühlrate von $1^{\circ}\text{C}/\text{Minute}$ gegeben war. Dies ließ sich mit einer Toleranz von $\pm 0,1^{\circ}\text{C}/\text{Minute}$ bis -80°C ohne Schwierigkeiten bewerkstelligen. Wenn diese Temperatur erreicht war, wurden die Versuchsröhrchen direkt in flüssigen Stickstoff überführt, wo sie auch gelagert wurden.

Für den Auftauvorgang wurde das Gestell mit den Versuchs- und Kontrollröhrchen direkt in das mit flüssigem Stickstoff halbgefüllte Thermosgefäß gebracht. Das Gefäß wurde nun soweit abgesenkt, daß die Röhrchen nur mehr im Stickstoffdampf hingen. Nun konnte die Auftaurate mittels Höhenverstellung des Thermosgefäßes leicht kontrolliert werden.

Von -196°C bis -90°C wurden etwa $10^{\circ}\text{C}/\text{Minute}$ eingehalten. Danach bis -5°C wurde die Auftaurate auf $5^{\circ}\text{C}/\text{Minute}$ verringert. Bei -5°C wurde in jedes Röhrchen 0,2 ml $37,5^{\circ}\text{C}$ warmes Kulturmedium gegeben und das Gestell mit den Röhrchen in ein Wasserbad gleicher Temperatur gebracht. Im Abstand von je 1 Minute wurden 0,2 ml, 0,4 ml und 1,0 ml Kulturmedium hinzugegeben, um eine rasche Herabsetzung der DMSO-Konzentration zu gewährleisten. Danach wurde jeweils ein Röhrchen in eine Petrischale ausgekippt und noch einmal mit 1 ml Kulturmedium ausgespült.

Die Eizellen wurden unter mikroskopischer Kontrolle in ein zweites Petrischälchen mit Kulturmedium umgesetzt, morphologisch beurteilt und wie in 3.1.7. beschrieben, 48 h kultiviert.

3.1.9. Rücktransplantation tiefgefrorener Eizellen

Zur Überprüfung der Methode wurden tiefgefrorene Eizellen rücktransplantiert.

3.1.9.1. Synchronisation des Rezipienten

Der Rezipient bekam 68 h vor der Transplantation eine intravenöse Injektion von 60 IE Primogonyl (s. 3.1.3.1.) zur Ovulationsauslösung (zeitgleiche Synchronisation).

3.1.9.2. Transplantation

Narkose und Operationsvorbereitung wurden entsprechend der Ausführung in 3.1.5.4. durchgeführt.

Nach einem Schnitt in der Linea alba zur Eröffnung der Bauchhöhle waren beide Uterushörner leicht vorzuverlagern. Jeweils 5 Eizellen, die nach dem Auftauvorgang noch eine Stunde im Kulturmedium gelagert worden waren, wurden mit einer in 3.1.6. beschriebenen Glaskapillare aufgezogen. Das betreffende Uterushorn wurde kurz kaudal der uterotubalen Verbindung an einer gefäßarmen Stelle mit einer dünnen Kanüle angestochen. Durch dieses praeformierte Loch wurde die Pipette etwa 2 cm in den Uterus Richtung Cervix eingeführt und entleert. Ein Verschluß der Uteruswunde erübrigte sich, die Bauchhöhle wurde in 3 Schichten verschlossen.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Statistische Auswertung (Überblick)

Zur statistischen Auswertung wurden die von MUDRA (1958) und WEBER (1972) veröffentlichten Grundlagen verwendet. Folgende Parameter wurden statistisch überprüft:

Ovulationsrate (3.2.2., Tab. 7): Varianzanalyse, t-Test

Wiederfindungsrate (3.2.3., Tab. 8): arc.sin.Transformation, Varianzanalyse, t-Test, Korrelation

Befruchtungsrate (3.2.4.): arc.sin.Transformation, Varianzanalyse, t-Test, Korrelation

In-vitro Kultivierung (3.2.6., Tab. 10): arc.sin.Transformation, Varianzanalyse, t-Test,

χ^2 -Test nur für Abtestung zwischen den Klassen.

Die Einzelergebnisse aller Tiere, die diesen Berechnungen zugrunde lagen, sind in den Tabellen 1, 2, 3, 4, 5 und 6 aufgeführt.

Tiefgefrierkonservierung (3.2.7., Tab. 11): χ^2 -Test

Tab. 1: Einzelergebnisse der superovulierten Tiere, Stadium I

Parameter	T i e r n u m m e r						
	1	2	3	4	5	6	7
Ovulationsrate	34	40	16	74	29	89	50
Wiederfindungs- rate in %	85,3	95,0	100	91,9	96,5	79,8	92,0
Befruchtungsrate in %	93,1	94,7	100	91,1	89,3	91,5	95,6
Kultivierungs- ergebnis in %	41,6	38,7	43,7	43,6	61,1	30,0	41,8
Anteil Eizellen in Klasse A (%)	100	100	93,7	93,5	100	100	100

Tab. 2: Einzelergebnisse der superovulierten Tiere, Stadium II

Parameter	T i e r n u m m e r							
	8	9	10	11	12	13	14	
Ovulationsrate	56	42	70	62	29	60	51	
Wiederfindungs- rate in %	85,7	85,7	60,0	90,3	96,5	68,3	84,3	
Befruchtungsrate in %	100	91,6	95,2	76,8	78,5	80,5	100	
Kultivierungs- ergebnis in %	40,9	51,5	35,9	32,5	73,7	57,6	37,3	
Anteil Eizellen in Klasse A (%)	45,8	72,7	67,5	69,7	95,4	57,5	58,1	

Tab. 3: Einzelergebnisse der superovulierten Tiere, Stadium III

Parameter	T i e r n u m m e r					
	15	16	17	18	19	20
Ovulationsrate	56	72	46	26	25	73
Wiederfindungs- rate in %	66,1	81,9	97,8	53,8	72,0	83,5
Befruchtungsrate in %	100	94,9	95,9	100	94,4	81,9
Kultivierungs- ergebnis in %	38,2	55,7	38,1	50,0	73,3	60,4
Anteil Eizellen in Klasse A (%)	51,3	62,5	60,4	92,8	82,3	64,0

Tab. 4: Einzelergebnisse der Tiere mit induzierter Ovulation, Stadium I

Parameter	T i e r n u m m e r						
	1	2	3	4	5	6	7
Ovulationsrate	9	8	8	7	11	11	10
Wiederfindungs- rate in %	88,8	100	50,0	85,7	81,8	100	100
Befruchtungsrate in %	87,5	100	100	100	100	100	100
Kultivierungs- ergebnis in %	42,8	75,0	25,0	66,6	66,6	50,0	33,3
Anteil Eizellen in Klasse A (%)	100	100	100	100	100	100	100

Tab. 5: Einzelergebnisse der Tiere mit induzierter Ovulation, Stadium II

Parameter	T i e r n u m m e r						
	8	9	10	11	12	13	14
Ovulationsrate	8	13	9	6	10	8	7
Wiederfindungs- rate in %	100	92,3	100	100	90,9	88,8	100
Befruchtungsrate in %	100	100	88,8	83,3	100	100	100
Kultivierungs- ergebnis in %	50,0	41,6	62,5	40,0	60,0	87,5	85,7
Anteil Eizellen in Klasse A (%)	100	100	100	40,0	100	100	100

Tab. 6: Einzelergebnisse der Tiere mit induzierter Ovulation, Stadium III

Parameter	T i e r n u m m e r									
	15	16	17	18	19	20	21			
Ovulationsrate	5	8	10	10	12	9	9			
Wiederfindungs- rate in %	100	87,5	90,0	80,0	100	100	100			
Befruchtungsrate in %	100	100	100	100	83,3	88,8	100			
Kultivierungs- ergebnis in %	60,0	50,0	66,6	62,5	70,0	57,1	66,6			
Anteil Eizellen in Klasse A (%)	100	100	100	100	100	100	100			

3.2.2. Ovulationsrate

Die mit HCG induzierte Ovulation erbrachte eine durchschnittliche Ovulationsrate von $9,0 \pm 1,9$ ($\bar{x} \pm s$). Die Superovulation mit FSH/LH bewirkte eine signifikante ($p < 0,01$) Steigerung auf $50,3 \pm 19,4$ ($\bar{x} \pm s$; Tab. 7). Innerhalb der 3 Stadien der induzierten Ovulation und der Superovulation unterschieden sich die jeweiligen Ovulationsraten nicht signifikant. Bei den superovulierten Tieren zeigte sich eine große individuelle Streuung hinsichtlich der Höhe der Ovulationsrate, die Extremwerte betrugen 16 bzw. 89 gezählte Corpora lutea (Tab.1).

3.2.3. Wiederfindungsrate

Die Methode der Eigewinnung, am getöteten Tier oder intra operationem, hatte keinen Einfluß auf die Höhe dieses Parameters. Deshalb werden die Ergebnisse im folgenden ohne Rücksicht auf die Eigewinnungsmethode zusammenfassend dargestellt (Tab. 8).

Im Stadium I (28 - 30 h post HCG bzw. LH) hatte die Superovulation im Vergleich zur induzierten Ovulation keinen Einfluß auf die Höhe der Wiederfindungsrate. Jedoch war bei den superovulierten Tieren die Höhe der Wiederfindungsrate signifikant negativ mit der Ovulationsrate korreliert ($r = - 0,74$, $p < 0,05$), d.h. mit steigender Ovulationsrate fiel die Wiederfindungsrate (Tab. 1).

Wurde die Eigewinnung 46 - 48 h post HCG bzw. LH durchgeführt (Stadium II), sank die Wiederfindungsrate in der Gruppe FSH/LH deutlich ab (von 91,5 % auf 81,5 %) und

Tab. 7: Ovulationsraten ($\bar{x} \pm s$) nach induzierter
Ovulation bzw. Superovulation

Entwicklungs- stadium	Tiere n	induz.Ovulation HCG	Tiere n	Superovulation FSH/LH
I	7	9,1 $\pm$ 1,6	7	47,4 $\pm$ 25,8**
II	7	9,0 $\pm$ 2,4	7	52,8 $\pm$ 13,7**
III	7	9,0 $\pm$ 1,9	7	50,7 $\pm$ 19,6**
Gesamt	21	9,0 $\pm$ 1,9	21	50,3 $\pm$ 19,4**

**Differenz zu HCG $p < 0,01$; t-Test

Tab. 8: Wiederfindungsraten nach induzierter
Ovulation bzw. Superovulation (%)

Entwicklungs- stadium	Tiere n	induz.Ovulation HCG	Tiere n	Superovulation FSH/LH
I	7	86,6 $\pm$ 17,8	7	91,5 $\pm$ 6,8
II	7	96,0 $\pm$ 5,1	7	81,5 $\pm$ 12,8**
III	7	93,9 $\pm$ 8,1	7	75,0 $\pm$ 14,1**
Gesamt	21	92,2 $\pm$ 11,8	21	82,7 $\pm$ 13,1**

**Differenz zu HCG $p < 0,01$; t-Test

unterschied sich damit signifikant ($p < 0,01$) von der HCG-Gruppe. Auch hier war die Wiederfindungsrate bei den superovulierten Tieren mit der Ovulationsrate korreliert ($r = - 0,77$, $p < 0,05$; Tab. 2).

Im Stadium III (66 - 68 h post HCG bzw. LH) zeigte sich ebenfalls ein deutlicher negativer Einfluß der Superovulation gegenüber der induzierten Ovulation auf die Wiederfindungsrate ($p < 0,01$). Im Gegensatz zu den früheren Stadien ergab sich bei den superovulierten Tieren eine positive Korrelation zur Ovulationsrate ($r = 0,3$), die jedoch nicht abgesichert werden konnte (Tab. 3).

Die Zusammenfassung aller 3 Stadien ergab eine signifikante ($p < 0,01$) Erniedrigung der Wiederfindungsrate nach Superovulation gegenüber der induzierten Ovulation. Auf eine Berechnung einer Gesamtkorrelation zwischen Ovulationsrate und Wiederfindungsrate wurde verzichtet, da die sehr differenzierten Ergebnisse in den 3 Stadien nur eine gesonderte Betrachtung zulassen.

In Tabelle 8 nicht aufgeführt ist die statistische Überprüfung der Unterschiede in den Wiederfindungsraten zwischen den 3 Stadien der Superovulationsgruppe. Danach war die Wiederfindungsrate in den Stadien II und III jeweils signifikant ($p < 0,05$) niedriger als im Stadium I. Der Unterschied zwischen Stadium II und III konnte nicht gesichert werden.

3.2.4. Befruchtungsrate

Alle als "unbefruchtet" klassifizierten Eizellen (insgesamt 80) waren Einzeller und wiesen keine Spermien in der Zona pellucida auf.

Trotz des geringen Unterschiedes von nur 4, 8 % zwischen den Gruppen HCG (96,3 %, n = 21) und FSH/LH (91,5 %, n = 21) unterschieden sich die Befruchtungsraten signifikant ($p < 0,01$). Eine Berechnung der Korrelation zwischen Befruchtungsrate und Ovulationsrate bei den 21 superovulierten Tieren (Tab. 1, 2 und 3) ergab einen Korrelationskoeffizienten von $r = - 0,25$ (nicht signifikant).

3.2.5. Morphologische Klassifizierung

Im Stadium I befanden sich alle 54 befruchteten Eizellen aus induzierter Ovulation im Zwei- bis Vierzellstadium und wiesen keine morphologischen Besonderheiten auf. Sie wurden deshalb alle der Klasse A zugeordnet (Tab. 9, Abb. 2). In der Gruppe FSH/LH waren ebenfalls alle 275 befruchteten Eizellen im Zwei- bis Vierzellstadium, davon wurden 5 Eizellen in die Klasse B (Abb. 3) eingestuft.

Im Stadium II wurden bei den Tieren mit induzierter Ovulation 58 befruchtete Eizellen (frühe Morula) gewonnen; davon wurden 3 Eizellen in die Klasse B (Abb. 5) eingeteilt, alle anderen waren ohne morphologische Besonderheiten (Klasse A; Abb. 4). In der Gruppe FSH/LH (262 Eizellen) konnten dagegen nur 64,1 % der untersuchten Eizellen in die Klasse A eingestuft werden. 11 Eizellen (4,2 %) wurden wegen unregelmäßigen, zerfallenden Blastomeren in die Klasse B eingeteilt, 56 (21,3 %) wiesen gegenüber der Klasse A eine deutlich geringere Blastomerenzahl auf (Klasse C; Abb. 6) und 27 Eizellen (10,4 %) wiesen darüber hinaus unregelmäßige Blastomerenformen mit unscharfen Begrenzungen auf (Klasse D; Abb. 7).

Tab. 9: Morphologische Klassifizierung
 Prozentualer Anteil der Eizellen
 in den einzelnen Klassen

	Entwicklungs- stadium	Anzahl Eizellen	K l a s s e n			
			A	B	C	D
induz.	I	54	100	-	-	-
Ovulation	II	58	94,8	5,2	-	-
HCG	III	56	100	-	-	-
Super- ovulation	I	275	98,2	1,8	-	-
	II	262	64,1	4,2	21,3	10,4
FSH/LH	III	256	64,9	5,5	12,8	16,8

Alle 66 - 68 h post HCG (Stadium III; induzierte Ovulation) gewonnenen Eizellen (56 späte Morula) konnten in die Klasse A (Abb. 8) eingestuft werden. In der Superovulationsgruppe wurden insgesamt 256 befruchtete Eizellen beurteilt. Davon wurden 166 (64,9 %) in Klasse A, 14 (5,5 %) in Klasse B (Abb. 9), 33 (12,8 %) in Klasse C (Abb. 10) und 43 (16,8 %) in Klasse D (Abb. 11) eingeteilt.

3.2.6. In-vitro Kultivierung

Die Gesamtergebnisse der in-vitro Kultivierung, ohne Differenzierung in Klassen, lassen eine Tendenz zu besseren Kultivierungserfolgen bei Eizellen aus induzierter Ovulation erkennen (s. Tab. 10).

Im Stadium II und III der Superovulationsgruppe, wo eine Aufteilung der Eizellen in 4 Klassen möglich war, wurde der Einfluß der Klasseneinteilung auf die Ergebnisse der in-vitro Kultivierung untersucht. Im Stadium II entwickelten sich in der Klasse A signifikant mehr Eizellen zu Blastocysten als in C und D ($p < 0,01$). Im Stadium III waren die Eizellen der Klasse A sowohl B ($p < 0,05$) als auch C und D ($p < 0,01$) überlegen. Darüber hinaus wurde überprüft, ob nach morphologischen Kriterien selektierte Eizellen, in diesem Fall Eizellen der Klasse A, ein besseres Kultivierungsergebnis erzielen als eine nicht-selektierte Population von Eizellen, hier die Zusammenfassung der Klassen A, B, C und D. Diese Annahme konnte im Stadium III der Superovulationsgruppe gesichert werden ($p < 0,05$).

Tab. 10: In-vitro Kultivierung

Anteil Blastocysten

an der Gesamtzahl kultivierter Eizellen (%)

	Entwicklungs- stadium	A	K l a s s e n			Gesamt
			B	C	D	
induz.	I	52,8	-	-	-	52,8
Ovulation	II	61,8	33,3	-	-	60,3
HCG	III	62,9	-	-	-	62,9
Super- ovulation	I	40,9	20,0	-	-	40,5
	II	56,9	30,0	29,6	3,7	44,2
FSH/LH	III	68,2	34,7	33,3	7,1	50,8

FSH/LH II : $p < 0,01$ A - C, A - D; χ^2 -Test

FSH/LH III : $p < 0,05$ A - B; χ^2 -Test

$p < 0,01$ A - C, A - D; χ^2 -Test

$p < 0,05$ A - Gesamt; t-Test

Abb. 2



Abb. 3



Abb. 2: Stadium I, Klasse A, Zweizeller

Abb. 3: Stadium I, Klasse B, zerfallende Blastomere

Vergrößerungsfaktor: 32 x 10 x 0,32

(Objektiv x Okular x Kleinbildfaktor)

Abb. 4

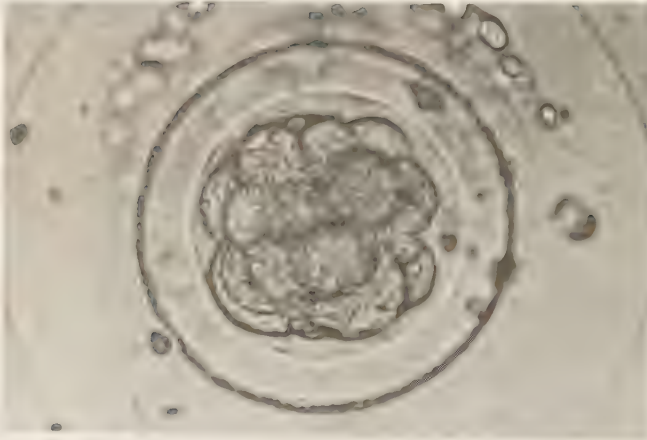


Abb. 5



Abb. 4: Stadium II, Klasse A, frühe Morula

Abb. 5: Stadium II, Klasse B, ungleichmäßige Blastomerengröße, unscharfe Blastomerengrenzen

Vergrößerungsfaktor: $32 \times 10 \times 0,32$

Abb. 6



Abb. 7



Abb. 6: Stadium II, Klasse C, reduzierte Blastomerenzahl gegenüber Klasse A (Abb. 4)

Abb. 7: Stadium II, Klasse D, starke Degenerationserscheinungen

Vergrößerungsfaktor: $32 \times 10 \times 0,32$

Abb. 8



Abb. 9



Abb. 8: Stadium III, Klasse A, späte Morula

Abb. 9: Stadium III, Klasse B, unregelmäßige Form
der Eizelle

Vergrößerungsfaktor: 32 x 10 x 0,32

Abb. 10



Abb. 11



Abb. 10: Stadium III, Klasse C, reduzierte Blastomerenzahl gegenüber Klasse A (Abb. 8)

Abb. 11: Stadium III, Klasse D, unregelmäßige Form der Eizelle sowie der Blastomeren

Vergrößerungsfaktor: $32 \times 10 \times 0,32$

3.2.7. Tiefgefrierkonservierung

Von drei Rezipienten, auf die je 10 tiefgefrierkonservierte Eizellen übertragen worden waren, hatte einer einen Wurf von 7 Jungtieren. Diese wiesen ein für diese Rasse durchschnittliches Geburtsgewicht und 4-Wochengewicht auf. Die damit erwiesene Entwicklungsfähigkeit tiefgefrorener Eizellen *in vivo* war die Voraussetzung für den Einsatz dieser Methode als Testsystem.

Von den jeweils 35 Eizellen pro Gruppe waren nach dem Auftauen 4 Eizellen aus Superovulation und 2 Eizellen aus induzierter Ovulation nicht mehr auffindbar. Von den 31 superovulierten Eizellen wiesen 14 Brüche und Defekte in der Albuminschicht auf, bei 2 Eizellen war die Zona pellucida gebrochen und ein Teil der Blastomeren verloren gegangen. Nach 48 h Kultur entwickelten sich 8 Blastocysten aus diesen Eizellen, davon 3 aus Eizellen mit defekter Albuminschicht. In der Gruppe mit induzierter Ovulation wiesen 7 von 33 wiedergefundenen Eizellen nach dem Auftauen Defekte in der Albuminschicht auf. Insgesamt entwickelten sich ebenfalls 8 Eizellen zu Blastocysten, davon 2 aus Eizellen mit defekter Albuminschicht (Tab. 11). Der unterschiedliche Anteil morphologisch intakter Eizellen war statistisch zu sichern ($p < 0,05$).

Tab. 11: Ergebnisse der Tiefgefrierkonservierung
Eigewinnung 66 - 68 h post HCG bzw. LH

	Anzahl Eizellen	Wieder- gefunden	Morpholo- gisch intakt	Anzahl Blastocysten nach 48 h Kultur
Superovulation FSH/LH	35	31	15	8
induz.Ovulation HCG	35	33	26*	8
Gesamt	70	64	41	16

* Differenz zu FSH/LH $p < 0,05; \chi^2$ -Test

4. DISKUSSION

Bei der Diskussion über den Einfluß der Superovulation auf physiologische Eigenschaften des weiblichen Genitale und der Eizellen sind zwei Fragen von besonderer Bedeutung:

1. Sind superovulierte Eizellen im weitesten Sinne "anomal" gegenüber Eizellen aus einer Ovulation mit physiologischer Eizahl?
2. Verändert die Superovulation das Milieu, in dem Befruchtung und Entwicklung der Eizellen vor sich gehen?

Sichtet und wertet man die umfangreiche Literatur über die Superovulation unter diesem Aspekt, so ergibt sich die Schwierigkeit, daß aus diesen Arbeiten, wegen der häufig auf andere Fragestellungen abgestimmten Versuchsanordnungen, keine direkten Schlüsse gezogen werden können. Ebenso sind selten Fragestellungen gewählt worden, bei denen die Wirkungsmechanismen der beiden erwähnten Problemkreise klar gegeneinander abzugrenzen sind.

Die Frage nach einer andersartigen Beschaffenheit der superovulierten Eizelle ist am deutlichsten durch Versuche zu beantworten, bei denen die Eizellen entweder keinen oder nur einen sehr kurzen Kontakt mit dem tubalen Milieu hatten. Dadurch sind sekundäre Einflüsse auf die Eizellen durch das umgebende Milieu weitmöglichst auszuschließen. Untersuchungen an superovulierten Eizellen, die während der intrafollikulären Reifung gewonnen wurden, erfüllen diese Voraussetzung am besten.

Bei den bisher untersuchten Spezies Maus, Ratte, Schwein, Schaf und Rind veränderte die Superovulation die Reifungs-

vorgänge im Ovar weder in ihrem zeitlichen Ablauf, noch beeinflusste sie die cytogenetischen Vorgänge (EDWARDS und GATES, 1959; ODOR, 1955; SPALDING et al., 1955; BERRY und SAVERY, 1958; HAFEZ und ISHIBASHI, 1964). Die Bedeutung dieser Ergebnisse wird unterstrichen durch die Untersuchung von DONAHUE (1972 b), der unter 2700 superovulierten Mäuseeizellen nur 1 primäre Oocyte fand. Alle anderen Eizellen hatten eine physiologische Entwicklung von der primären Oocyte in der Prophase I zur sekundären Oocyte in der Metaphase II durchgemacht. Dagegen wurde beim Schwein ein relativ hoher Prozentsatz unreifer Eizellen (8 %) nach Superovulation festgestellt, der vor allem durch ein gehäuftes Auftreten bei sehr hohen Ovulationsraten (>45) zustande kam (HUNTER, 1968). Da dies für das Schwein extrem hohe Ovulationszahlen sind, könnte der Widerspruch zu den Beobachtungen von SPALDING et al. (1955) durch eine Differenz in der Ovulationsrate bedingt sein. Von cytogenetischen Veränderungen abgesehen, ist bisher nur beim Kaninchen nachgewiesen, daß die Ultrastruktur frisch ovulierter Eizellen aus einer provozierten Ovulation weder durch die induzierte Ovulation noch durch die Superovulation verändert wird (LONGO, 1974). ROTTMANN und STRANZINGER (1977) vermuten jedoch, daß superovulierte Kanincheneizellen eine andere Struktur der Zona pellucida aufweisen als Eizellen aus induzierter Ovulation.

Deutliche Hinweise, daß superovulierte Eizellen spontan ovulierten vergleichbare Eigenschaften besitzen, sind auch den Untersuchungen von ADAMS (1962) und MAURER et al. (1968 b) zu entnehmen. Die Entwicklung zu lebenden Jungtieren waren bei beiden gleich, wenn sie in physiologischer Anzahl auf nicht superovulierte Rezipienten übertragen wurden. Diesen Befunden, die gegen die Hypothese von der "anormalen" superovulierten Eizelle sprechen, stehen Untersuchungen gegenüber, deren Ergebnisse zu differenzierteren Überlegungen führen.

MIYAMOTO und CHANG (1973) stellten bei Versuchen zur in-vitro Fertilisation von Eizellen aus Spontan- und Superovulation adulter Ratten fest, daß der Einfluß der Superovulation nur bei bestimmten Versuchsanordnungen sichtbar war. Wurden die Eizellen mit Sperma inkubiert, das 4 - 5 h in-vivo kapazitiert worden war, erzielten die Autoren die absolut höchsten Befruchtungsraten und es war kein Unterschied zwischen spontan- und superovulierten Eizellen gegeben. Nach einer Verlängerung der Kapazitationsdauer der Spermien auf 10 - 11 h verschlechterten sich die in-vitro Befruchtungsraten in beiden Gruppen, jetzt aber waren spontan ovulierte Eizellen deutlich überlegen. Eine vorsichtige Interpretation dieser Ergebnisse läßt den Schluß zu, daß superovulierte Eizellen nur in bestimmten Bereichen oder bis zu einer gewissen Belastung wie spontan ovulierte Eizellen reagieren, außerhalb dieser Grenzen jedoch davon abweichen. Dies trifft auch auf die Versuche von GÖTZE (1973) sowie GÖTZE und PAUFLER (1976) zu. Wurde zur Besamung bei Kaninchen mit induzierter Ovulation bzw. Superovulation Frischsperma verwendet, differierten die Anteile unbefruchteter und degenerierter Eizellen nur wenig. Kam jedoch Tiefgefriersperma oder röntgenbestrahltes Sperma zum Einsatz, erhöhte sich dieser Anteil bei den superovulierten Tieren wesentlich stärker als bei den Tieren mit induzierter Ovulation. Auch dies kann bedeuten, daß superovulierte Eizellen auf suboptimale Bedingungen empfindlicher als spontan ovulierte Eizellen reagieren.

Die zweite Frage ist, ob die Superovulation das Milieu verändert, in dem Befruchtung und Entwicklung vor sich gehen. Es gibt keine direkten Hinweise, daß die Superovulation das tubale und uterine Milieu beeinflusst. Da aber bekannt ist, daß die Komposition der Genitalsekrete zyklusabhängig gesteuert wird (HAMNER, 1971), ist sehr wohl vorstellbar, daß die von mehreren Autoren beobachteten Veränderungen der Hormonspiegel superovulierter Tiere einen ähnlichen Effekt ausüben.

Solche Veränderungen der Hormonreliefs wurden sowohl um den Zeitpunkt der Ovulation und Befruchtung (GUTHRIE et al., 1974; HENRICKS et al., 1973) als auch in der folgenden Entwicklungsphase der Eizellen bis zur Implantation beobachtet (GREENWALD, 1976; GUTHRIE et al., 1974; WEBEL et al., 1975).

Die Diskrepanz zwischen der hohen Zahl befruchteter Eizellen und der weitaus geringeren Zahl von Implantationsstellen, die bei Maus und Kaninchen beobachtet wurde (ADAMS, 1960; ALLEN und McLAREN, 1971; BEAUMONT und SMITH, 1975), ist ein weiterer indirekter Hinweis auf einen Wirkungsmechanismus via Genitalsekrete, die gerade in dieser Phase eine entscheidende Bedeutung für die Entwicklung der Eizelle besitzen. Diese Bedeutung wird durch die Versuche von HUNTER (1968) unterstrichen. Die Auflösung einer Superovulation beim Schwein in der Lutealphase (6. Tag des Zyklus), hatte eine Polyspermierate von 60 % zur Folge. Die durch die Progesterondominanz veränderten Genitalsekrete müssen die Ursache dieses Phänomens gewesen sein, da es nicht auftrat, wenn Eizellen aus einer solchen Superovulation auf östrische inseminierte Rezipienten übertragen wurden.

Die Veränderung des genitalen Milieus wird auch von PAUFLER et al. (1975) aufgegriffen, um Chromosomenstrukturveränderungen zu erklären, die in superovulierten Kaninchenblastocysten gefunden wurden. Die Schlußfolgerung dieser Autoren wird durch keine sonstigen Hinweise in der Literatur unterstützt. Die beobachteten Veränderungen könnten aber einen Einfluß der Superovulation auf den Fruchttod auch nach der Implantation erklären. Direkte Auswirkungen der Superovulation auf die postimplantären Verluste sind bisher nicht beschrieben. Als entscheidender limitierender Faktor für die postimplantäre Entwicklung wird die räumliche Uteruskapazität angesehen.

Gegen die Hypothese, daß die Superovulation das tubale und uterine Milieu verändert, sprechen nur die gegenüber der Spontanovulation vergleichbaren Befruchtungsraten (FOWLER und EDWARDS, 1957; KENELLY und FOOTE, 1965; HUNTER, 1966).

Dieser Vielfalt von Ergebnissen, die sich nur zum Teil zusammenhängend interpretieren lassen, stehen die Anforderungen der Praxis beim Einsatz der Superovulation im Rahmen der Eitransplantation gegenüber. Einzig verfügbares Kriterium für die Beurteilung einer Eizelle ist dort die morphologische Begutachtung im Lichtmikroskop, deren Ergebnis entscheidend ist für eine weitere Verwendung der Eizelle. Dies gilt auch für Verfahren wie die in-vitro Kultivierung oder Tiefgefrierkonservierung, also immer, wenn die Lebensfähigkeit der Eizelle nicht beeinträchtigt werden darf. Zwar hat gerade die Möglichkeit der Eitransplantation beim Rind die Diskussion um die Superovulation intensiviert, jedoch sind grundsätzliche Untersuchungen bei dieser Spezies aus Kostengründen nicht möglich. Deshalb muß versucht werden, die Ergebnisse, die bei anderen Tieren erarbeitet werden, auf diese Spezies zu übertragen. Dabei ist zu berücksichtigen, daß dann eine unipare Spezies mit multiparen Spezies verglichen werden muß. Welch unterschiedliche Bedingungen dabei vorliegen, soll ein einfaches Beispiel verdeutlichen: während bei den multiparen Labortieren Maus, Kaninchen und Hamster die physiologische Ovulationsrate durch die Superovulation um den Faktor 3 bis 5 erhöht wird, ist beim Rind eine 10 - 20-fache Erhöhung möglich. Derart hohe Eizahlen werden aus wirtschaftlichen und züchterischen Gründen angestrebt.

Für die eigenen Untersuchungen wurde als Modelltier das Kaninchen gewählt. Zentrales Anliegen war dabei, morphologische Kriterien für die Differenzierung und Selektion

von superovulierten Eizellen zu erarbeiten. An Hand dieser Merkmale sollten mit Methoden der in-vitro Kultivierung und Tiefgefrierkonservierung Rückschlüsse auf den Wert einer solchen Beurteilung ermöglicht werden. Als Kontrollmaterial dienten dabei jeweils Eizellen aus einer induzierten Ovulation.

Die erzielten durchschnittlichen Ovulationsraten nach induzierter Ovulation ($9,0 \pm 1,9$; $\bar{x} \pm s$) und Superovulation ($50,3 \pm 19,4$) decken sich in etwa mit den Ergebnissen von KENNELLY und FOOTE (1965), auf deren Arbeit die heute übliche Methode der Superovulation beim Kaninchen zurückgeht.

Die Höhe der Wiederfindungsrate war abhängig von der Zahl der ovulierten Eizellen und vom Zeitpunkt der Eigewinnung. Der signifikante Abfall der Wiederfindungsrate bei den superovulierten Tieren 46 - 48 h post LH (Stadium II) sowie 66 - 68 h post LH (Stadium III) ist vorerst nur durch Hypothesen zu erklären. BEAUMONT und SMITH (1975) beobachteten bei der Maus einen gleichartigen, aber sehr viel stärker ausgeprägten Effekt. Parallel dazu konnten die Autoren einen starken Abfall des Anteils "anomaler" Eizellen feststellen. Sie nahmen deshalb an, daß der Abfall in der Wiederfindungsrate durch die Eliminierung abgestorbener Eizellen im weiblichen Genitale bedingt ist. In den eigenen Untersuchungen wurde dagegen ein Anstieg des Anteils "anomaler" Eizellen beobachtet. Trotzdem kann beiden Ergebnissen der gleiche Wirkungsmechanismus zugrunde liegen. Da BEAUMONT und SMITH am 2. Tag und 4. Tag post coitum untersuchten, ging in ihre Ergebnisse auch noch der Vorgang der Blastulation ein, der in dieser Zeit abläuft. Unter Umständen stellt dies eine Schwelle dar, die bereits vorher geschädigte Eizellen nicht überwinden können. Da dieser Zeitraum in der vorliegenden Arbeit nicht mehr berücksichtigt wurde, konnte wahrscheinlich nur der Beginn dieses

Vorgangs, nämlich das Zurückbleiben und Degenerieren der Eizellen, beobachtet werden. Die Auswirkungen auf die Wiederfindungsrate waren deshalb noch nicht so gravierend.

Der wechselnde Einfluß der Ovulationsrate bei den superovulierten Tieren auf die Wiederfindungsrate in den verschiedenen Stadien ist wahrscheinlich auf die große Variabilität der Ergebnisse und das begrenzte Zahlenmaterial von je 7 Tieren pro Stadium und Gruppe zurückzuführen (Tab. 1, 2 und 3).

Der geringe Unterschied der durchschnittlichen Befruchtungsraten (HCG 96,3 %; FSH/LH 92,5 %) weist darauf hin, daß dieser Faktor gegenüber anderen Ursachen der praeimplantären Verluste quantitativ keine entscheidende Rolle spielt. Die individuelle Streuung der Befruchtungsraten in beiden Gruppen ist gering (Tab. 1, 2, 3, 4, 5 und 6). Die Differenz von 3,8 % ($p < 0,01$) ist deshalb als Hinweis anzusehen, daß bei superovulierten Tieren eine gewisse Beeinträchtigung der Fertilisation gegeben ist. Da die Befruchtungsrate bei den superovulierten Tieren unabhängig von der Ovulationsrate war, scheint durch die Superovulation an sich dieser negative Einfluß zu entstehen. Damit ist eine ätiologische Beteiligung der Genitalsekrete bei der Depression der Befruchtungsrate wahrscheinlicher als die Beschaffenheit der Eizellen als Ursache dafür.

Die morphologische Differenzierung der befruchteten Eizellen erschien insbesondere deshalb von Bedeutung, weil in der Literatur keine Einzelheiten über die Beurteilung und Selektion von Eizellen angegeben werden, auch dann nicht, wenn eine Einteilung nach dem Prinzip "normal-anomal" erfolgt (GÖTZE, 1973; BEAUMONT und SMITH, 1975; GÖTZE und PAUFLER, 1976). Die Grenze wird von den Autoren

gezogen, ohne genaue Angabe der Kriterien, die für die Klassifizierung maßgebend waren.

Mit den in dieser Arbeit beschriebenen Kriterien sollten die Voraussetzungen für vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse bei wissenschaftlichen Untersuchungen, sowie für die Selektion und Beurteilung von Eizellen im Rahmen des biotechnischen Einsatzes der Eitransplantation geschaffen werden. Die angewendeten Kriterien (s. 3.1.6.2.) wurden nach folgenden Überlegungen erarbeitet: Dem Absterben einer Eizelle können verschiedene Mechanismen zugrunde liegen, jedoch erschienen zwei Möglichkeiten besonders relevant. Entweder treten bei einem bestimmten Entwicklungsstand einer Eizelle, die bis dahin morphologisch ohne Besonderheiten ist (Klasse A) Degenerationerscheinungen auf, die ihr morphologisches Äquivalent in zerfallenden Blastomeren oder einer unregelmäßigen Form der Eizelle haben (Klasse B), oder es kommt zuerst zu einer verzögerten Entwicklung, die in einer reduzierten Blastomerenzahl resultiert (Klasse C) und als Folge einer weiteren Asynchronität zwischen Entwicklungsstand der Eizelle und genitalem Milieu schließlich ebenfalls zu einer Degeneration führt (Klasse D).

Eizellen aus induzierter Ovulation zeigten praktisch keine Abweichungen von der Norm. Von 168 Eizellen wurden 165 in die Klasse A (morphologisch ohne Besonderheiten) und nur 3 in die Klasse B (zerfallende Blastomeren) eingestuft. Diese Ergebnisse können in etwa mit den Angaben von ADAMS (1960) verglichen werden, der beim Kaninchen die prae-implantären Verluste, einschließlich der nicht befruchteten Eizellen, mit 9,7 % angibt. Auch bei den superovulierten Tieren war 28 - 30 h post LH (Stadium I) eine Möglichkeit der morphologischen Differenzierung kaum gegeben.

Dies bedeutet, daß hier keine verlängerte Ovu-

lationsdauer, wie sie von VARIAN et al. (1967) vermutet wird, vorlag. Da aber bereits 24 h später der Anteil der in die Klassen B, C und D eingestuften Eizellen auf 35,9 % anstieg, müssen andere Faktoren für diese Asynchronität verantwortlich sein. Dabei beherrschte ein Zurückbleiben in der Entwicklung, also die Klasse C, sehr deutlich das Erscheinungsbild dieser Eizellen. Als logische Folge dieses Phänomens ist die Verschiebung von Klasse C nach Klasse D im Stadium III aufzufassen, da die vorher nur retardierten Eizellen in Folge der beschriebenen Asynchronität nun degenerative Veränderungen zeigten. Da die Gesamtzahl der in Klasse A eingestuften Eizellen sich gegenüber dem Stadium II nicht veränderte, muß angenommen werden, daß bereits sehr früh, nämlich zwischen Zweizeller und früher Morula, ein Selektionsmechanismus einsetzt. Ursachen und Bedeutung dieses Vorganges können in diesen Versuchen nicht näher bestimmt werden. Neben einer ätiologischen Beteiligung des tubalen und uterinen Milieus ist auch an chromosomale Defekte zu denken.

Bei Verwendung der Nomenklatur anderer Autoren (GÖTZE, 1973; GÖTZE und PAUFLER, 1976) wäre die Klasse A als "normal", alle anderen als "anomal" zu bezeichnen. Der damit mögliche direkte Vergleich zeigt, daß bei den oben genannten Arbeiten die Zahlen "normal" klassifizierter Eizellen (60 h post FSH/HCG) höher liegen, nämlich zwischen 72,5 % und 78,5 % (GÖTZE) sowie 87,6 % (GÖTZE und PAUFLER). Da in diesen Zahlen auch noch die unbefruchteten Eizellen miteingeschlossen sind, muß angenommen werden, daß nur Eizellen der Klasse D als "anomal" bezeichnet wurden. Dies erscheint auch deswegen wahrscheinlich, weil die Beurteilung bei einer Gesamtvergrößerung von 10 : 1 erfolgte. Dabei ist nur eine relativ grobe Beurteilung der morphologischen Beschaffenheit möglich.

Die Testung der Entwicklungsfähigkeit in-vitro ergab, daß Eizellen aus induzierter Ovulation superovulierten Eizellen nicht überlegen sind, wenn auch eine leichte Tendenz dazu beobachtet werden konnte (Tab. 10). Dies stimmt überein mit den an Mäusen erarbeiteten Ergebnissen von SPINDLE und GOLDSTEIN (1975). Hervorzuheben ist jedoch die Überlegenheit der superovulierten Eizellen in Klasse A des Stadiums III gegenüber dem Gesamtergebnis in diesem Stadium ($p < 0,05$). Damit wird der Wert einer morphologischen Selektion superovulierter Eizellen und der ihr zugrunde liegenden Kriterien bestätigt. Ein alleiniger Ausschluß der Klasse D im Sinne einer Einteilung "normal-anomal" hätte nicht zu einer signifikanten Überlegenheit gegenüber dem Gesamtergebnis geführt.

Wegen des geringen Zahlenmaterials lassen sich die Ergebnisse der Tiefgefrierkonservierung nur unter Vorbehalten diskutieren. Bei superovulierten Eizellen war der Anteil defekter Formen nach dem Auftauen höher als bei Eizellen aus induzierter Ovulation ($p < 0,05$). Auf die Rate der in-vitro weiterentwickelten Eizellen wirkte sich dies jedoch nicht aus. Dies kann aber nur auf das beschriebene Verfahren zur Tiefgefrierkonservierung bezogen werden. Schon geringfügige Änderungen etwa der DMSO-Konzentration könnten zu anderen Ergebnissen führen. Gerade die Untersuchungen von MIYAMOTO und CHANG (1973) haben auf die Abhängigkeit der Unterschiede zwischen spontan- und superovulierten Eizellen von der Versuchsanordnung hingewiesen.

Schlußfolgerung:

Beim Kaninchen weisen superovulierte Eizellen im Vergleich zu Eizellen aus induzierter Ovulation einen höheren Anteil von Entwicklungsstörungen auf. Im Vordergrund steht dabei eine Retardierung der Teilungsvorgänge mit anschließenden Degenerationerscheinungen. Eine morphologische Differenzierung und damit eine bedingte Aussage über das Entwicklungsvermögen dieser Eizellen ist beim Kaninchen ab dem frühen Morula-Stadium möglich.

Es wird angenommen, daß bei anderen Spezies ähnliche Zusammenhänge gegeben sind. Da eine morphologische Beurteilung vorerst die einzig praktisch mögliche Selektionsmethode für Eizellen ist, sollte vermehrt auf Zusammenhänge zwischen Morphologie und Entwicklungsfähigkeit bei superovulierten Eizellen geachtet werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Als Modell für den Einsatz der Superovulation und Eitransplantation beim Rind wurde am Kaninchen überprüft, ob sich superovulierte Eizellen von solchen aus induzierter Ovulation in ihrer morphologischen Beschaffenheit, ihrem Entwicklungsvermögen in-vitro und in ihrer Eignung für die Tiefgefrierkonservierung unterscheiden.

2. Die Versuche wurden mit Kaninchen der Rasse "Weiße Neuseeländer" durchgeführt.

Die induzierte Ovulation wurde mit HCG (20 IE/kg KGW i.v.) ausgelöst, die Superovulation mit 0,3 mg FSH s.c., 6 x im Abstand von 12 h, sowie 2,5 mg LH i.v. 15 h nach der letzten FSH-Applikation.

Die Tiere wurden gleichzeitig mit der HCG- bzw. LH-Verabreichung besamt.

Die Eigewinnung erfolgte 28 - 30 h (Stadium I, Zwei- bis Vierzeller), 46 - 48 h (Stadium II, frühe Morula) und 66 - 68 h (Stadium III, späte Morula) nach der HCG- bzw. LH-Applikation.

Für die morphologische Beurteilung und die in-vitro Kultivierung wurden in jedem Stadium die Eizellen von je 7 Tieren mit induzierter Ovulation bzw. Superovulation verwendet.

Die morphologische Untersuchung der Eizellen erfolgte mit einem Umkehrmikroskop bei einer Gesamtvergrößerung bis zu 400-fach. Die befruchteten Eizellen wurden entsprechend ihrer Beschaffenheit in 4 Klassen eingeteilt: Klasse A (morphologisch ohne Besonderheiten), Klasse B (zer-

fallende Blastomeren oder unregelmäßige Form), Klasse C (reduzierte Blastomerenzahl) und Klasse D (Eizellen mit stärkeren Degenerationerscheinungen als in Klasse B oder C).

Die Eizellen wurden in Ham-F 10 kultiviert, dem 1,5 % BSA zugefügt worden war. Die Kultivierungsdauer betrug 96 h für Zwei- bis Vierzeller, 72 h für frühe Morula und 48 h für späte Morula. Als Maßstab für den Kultivierungserfolg diente die Entwicklung zum Stadium der expandierten Blastocyste.

An 70 Eizellen im späten Morula-Stadium, die zu gleichen Teilen von je 5 Tieren mit induzierter Ovulation und Superovulation stammten, wurde deren Eignung für die Tiefgefrierkonservierung untersucht.

3. Die durchschnittliche Ovulationsrate nach induzierter Ovulation betrug $9,0 \pm 1,9$ ($\bar{x} \pm s$), nach Superovulation $50,3 \pm 19,4$ ($p < 0,01$).

Die Wiederfindungsrate bei superovulierten Tieren war in den Stadien II und III niedriger als im Stadium I ($p < 0,05$) und ebenfalls niedriger als im Stadium II und III nach induzierter Ovulation ($p < 0,01$).

Nach induzierter Ovulation waren 96,3 %, nach Superovulation 92,5 % der Eizellen befruchtet.

Von den insgesamt 168 Eizellen aus induzierter Ovulation waren 165 (98,2 %) morphologisch ohne Besonderheiten. Nach Superovulation waren im Stadium I 270 von 275 Eizellen (98,2 %), im Stadium II 168 von 262 Eizellen (64,1 %) und im Stadium III 166 von 256 Eizellen (64,9 %) ohne morphologische Besonderheiten.

Superovulierte Eizellen der Klasse A im Stadium II entwickelten sich häufiger zu Blastocysten als Eizellen der Klasse C und D ($p < 0,01$), im Stadium III war die Klasse A sowohl B ($p < 0,05$) als auch C und D ($p < 0,01$) überlegen.

Nach der Tiefgefrierkonservierung wiesen superovulierte Eizellen häufiger Defekte auf als solche aus induzierter Ovulation. Die Entwicklungsfähigkeit in-vitro der beiden Gruppen unterschied sich jedoch nicht signifikant.

4. Superovulierte Eizellen des Kaninchens weisen gegenüber solchen einer induzierten Ovulation einen erheblich höheren Anteil an Entwicklungsstörungen auf. Wenn diese Ergebnisse auch für andere Spezies zutreffen, könnte der biotechnische Einsatz der Superovulation und Eitransplantation in der Haustierzucht eine gewisse Begrenzung erfahren.

Summary

1. As a model for the use of superovulation and egg transfer in cattle, an investigation with rabbits was undertaken of how superovulated ova differ from ova obtained from induced ovulation regarding their morphological appearance, their developmental potential in vitro and their suitability for low temperature storage.

2. New Zealand White rabbits were used in this study.

The induced ovulation was achieved by HCG (20 IE/kg body weight i.v.), superovulation by 0,3 mg FSH s.c., 6 times at an interval of 12 hours, followed by 2.5 mg LH i.v., 15 hours after the last FSH-injection.

Each doe was artificially inseminated at the time HCG or LH was administered.

Egg recovery was performed 28 - 30 h (stage I, 2 - 4 cell), 46 - 48 h (stage II, early morula) and 66 - 68 h (stage III, late morula) after the injection of HCG or LH.

For morphological and developmental investigations, 7 animals per group (induced ovulation as well as superovulation) and stage were used.

The morphological examination was carried out with an inverted microscope with a 400 fold magnifying capacity. Fertilized ova were distributed to four classes according to their morphological appearance: class A (without any damage), class B (disintegrating blastomeres or unregular shape), class C (reduced number of blastomeres) and class D (ova with stronger forms of degeneration).

The ova were cultivated in Ham-F 10, supplemented with 1.5 % BSA. Time of culture was 96 h for 2 - 4 cell embryos, 72 h for early morula and 48 h for late morula. The expanded blastocyst was considered to be a criterion for successful culture.

For low temperature storage, 35 ova were collected from 5 animals with induced ovulation and 35 ova from 5 animals with superovulation.

3. HCG-administration resulted in a mean of 9.0 ± 1.9 ($\bar{x} \pm s$) ovulations, superovulation treatment increased the number of ovulations to 50.3 ± 19.4 ($p < 0.01$).

In superovulated animals, the egg recovery rate was lower at stage II and III than at stage I ($p < 0.05$) and also lower compared with stage II and III of induced ovulation ($p < 0.01$).

Induced ovulation and superovulation resulted in rates of 96.3 % and 92.5 % of the eggs fertilized respectively ($p < 0.01$).

After induced ovulation 165 out of 168 ova (stage I, II and III; 98.8 %) did not show any morphological damage. Superovulation at stage I produced 270 out of 275 ova (98.2 %) which were distributed to class A. At stage II and III, this percentage showed a distinct decline to 64.1 % (168 out of 262) and 64.9 % (166 out of 256) respectively.

Superovulated ova of class A at stage II more often developed to blastocysts than ova of classes C and D ($p < 0.01$); at stage III, ova of class A were also superior to B ($p < 0.05$) as well as C and D ($p < 0.01$).

Low temperature storage produced a higher percentage of deficiencies in superovulated ova, compared with ova obtained from induced ovulation ($p < 0.05$). This, however, did not affect their ability to develop in vitro.

4. Superovulated rabbit ova show a considerably higher proportion of developmental anomalies, compared with ova from induced ovulation. If these results

can be applied to other species, biotechnical use of superovulation and egg transfer in domestic animal breeding might be limited.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ADAMS, C.E. (1960)

Prenatal mortality in the rabbit,

Oryctolagus cuniculus

J. Reprod. Fert. 1 : 36

ADAMS, C.E. (1962)

Studies on prenatal mortality in the rabbit,

Oryctolagus cuniculus: the effect of transferring varying number of eggs

J. Endocrin. 24 : 471

ALLEN, J. und McLAREN, A. (1971)

Cleavage rate of mouse eggs from induced and spontaneous ovulation

J. Reprod. Fert. 27 : 137

AUSTIN, C.R. (1961)

The mammalian egg

Blackwell Scientific Publications Oxford

AUSTIN, C.R. (1969)

Variations and anomalies in fertilization

In Fertilization Vol. II C.B. Metz and A. Monroy (eds.) Academic Press, New York

AUSTIN, C.R. und BRADEN, A.W.H. (1954)

Anomalies in rat, mouse and rabbit eggs

Aust. J. Biol. Sci. 7 : 537

AVERY, T.L. und GRAHAM, E.F. (1962)

Investigations associated with the transplantation of bovine ova. II. Superovulation

J. Reprod. Fert. 2 : 212

- BANK, H. und MAURER, R.R. (1974)
Survival of frozen rabbit embryos
Exp. Cell Res. 89 : 188
- BEATTY, R.A. (1958)
Variation in the number of corpora lutea and in
the number and size of 6-days blastocysts in
rabbits subjected to superovulation treatment
J. Endocrin. 17 : 248
- BEAUMONT, H.M. und SMITH, A.S. (1975)
Embryonic mortality during the pre- and post
implantation periods of pregnancy in mature mice
after superovulation
J. Reprod. Fert. 45 : 437
- BERRY, R.O. und SAVERY, H.P. (1958)
A cytological study of the maturation process
of the ovum of the ewe during normal and induced
ovulation
In: Reproduction and Infertility p. 75
III. Symposium F.X. Gassner (ed.) Pergamon
- BETTERIDGE, K.J. und MITCHELL, D. (1974)
Embryo transfer in cattle: experience of twenty-
four completed cases
Theriogenology 1 : 69
- BILTON, R.J. und MOORE, N.W. (1976)
In vitro culture, storage and transfer of goat embryos
Aust. J. biol. Sci. 29 : 125
- BOYD, E.C., HAMILTON, W.J. und HAMMOND, J., Jr. (1944)
Transuterine (internal) migration of the ovum
in sheeps and other mammals
J. Anat., Lond. 78 : 5

BRADEN, A.W.H. (1957)

Variation between strains in the incidence of various abnormalities of egg maturation and fertilization in the mouse

J. Genet. 55 : 476

BRINSTER, R.L. (1963)

A method for in vitro cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst

Exp. Cell Res. 32 : 205

BRINSTER, R.L. (1965 a)

Studies on the development of mouse embryos in vitro. I. The effect of osmolarity and hydrogen ion concentration

J. exp. Zool. 158 : 49

BRINSTER, R.L. (1965 b)

Studies on the development of mouse embryos in vitro. II. The effect of energy source

J. exp. Zool. 158 : 59

BRINSTER, R.L. (1965 c)

Studies on the development of mouse embryos in vitro. III. The effect of fixed-nitrogen source

J. exp. Zool. 158 : 69

BRINSTER, R.L. (1965 d)

Studies on the development of mouse embryos in vitro. IV. Interaction of energy sources

J. Reprod. Fert. 10 : 222

BRINSTER, R.L. (1968)

Effect of glutathion on the development of two-cell mouse embryos in vitro.

J. Reprod. Fert. 17 : 521

- BRINSTER, R.L. und THOMSON, J.L. (1966)
Development of eight-cell mouse embryos
in vitro
Exp. Cell Res. 42 : 308
- DAY, G. (1965)
Use of gonadotrophins to synchronize
estrous cycles in swine
J. Anim. Sci. 24 : 1075
- DONAHUE, R.P. (1972 a)
Fertilization of the mouse oocyte:
sequence and timing of nuclear progression
to the two-cell stage
J. exp. Zool. 180 : 304
- DONAHUE, R.P. (1972 b)
The relation of oocyte maturation to
ovulation in mammals
In: Oogenesis p. 413 J.D. Biggers and
A.W. Schuetz (eds.) University Park Press
Baltimore, Butterworths London
- EDWARDS, R.G. und FOWLER, R.E. (1959)
Fetal mortality in adult mice after superovu-
lation with gonadotrophins
J. exp. Zool. 141 : 299
- EDWARDS, R.G. und FOWLER, R.E. (1960)
Superovulation treatment of adult mice;
their subsequent natural fertility and
response to further treatment
J. Endocrin. 21 : 147

EDWARDS, R.G. und GATES, A.H. (1959)

Timing of the stages of the maturation
division, ovulation, fertilization and the
first cleavage of eggs of adult mice treated
with gonadotrophins
J. Endocrin. 18 : 292

ELBLING, L. (1975)

Congenital malformations in mice after gonado-
trophin induced ovulation
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 149 : 376

FOWLER, R.E. und EDWARDS, R.G. (1957)

Induction of superovulation and pregnancy
in mature mice by gonadotrophins
J. Endocrin. 15 : 374

FUJIMOTO, S., PAHLAVAN, N. und DUKELOW, W.R. (1974)

Chromosome abnormalities in rabbit pre-
implantation blastocysts induced by super-
ovulation
J. Reprod. Fert. 40 : 177

GÖTZE, G. (1973)

Die Wirkung von Röntgenbestrahlungen, von
Samenkonserverungsmethoden und von Ovula-
tionsbeeinflussungen auf die Befruchtung und
den embryonalen Fruchttod beim Kaninchen
Vet. med. Diss., Hannover

GÖTZE, G. und PAUFLE, S. (1976)

Besamungsergebnisse und praeinatale Mortalität
nach Verwendung von Flüssig- und Tiefgefrier-
sperma beim Kaninchen bei normaler Ovulations-
auslösung und Superovulation
Zuchthygiene 11 : 169

- GREENWALD, G.S. (1976)
Effects of superovulation on fetal development and hormone levels in the pregnant hamster
J. Reprod. Fert. 48 : 313
- GUTHRIE, H.D., HENRICKS, D.M. und HANDLIN, D.L. (1974)
Plasma hormone levels and fertility in pigs induced to superovulate with PMSG
J. Reprod. Fert. 41 : 361
- HAFEZ, E.S.E. (1964)
Effects of overcrowding in uterus on implantation and fetal development in the rabbit
J. exp. Zool. 156 : 269
- HAFEZ, E.S.E. und ISHIBASHI, I. (1964)
Maturation in bovine oocytes following gonadotropin injections
Cytogenetics 3 : 167
- HAFEZ, E.S.E., SUGIE, T. und GORDON, I. (1963)
Superovulation and related phenomena in the beef cow. I. Superovulatory response following PMSG and HCG injections
J. Reprod. Fert. 5 : 359
- HAHN, J., ADY, G. und SCHNEIDER, U. (1977)
Über den Einfluß der Superovulation auf die Entwicklung in vitro befruchteter Kaninchen-eizellen
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 84 : 232
- HAMILTON, W.J. und LAING, J.A. (1946)
Development of the egg of the cow up to the stage of blastocyst formation
J. Anat. (London) 80 : 194

HAMNER, C. E. (1971)

Composition of oviductal and uterine fluids

In: Advances in the Bioscience 6 : 145

Pergamon Press, Vieweg

HANCOCK, J.L. (1961)

Fertilization in the pig

J. Reprod. Fert. 2 : 307

HENRICKS, D.M., HILL, J.R., DICKEY, J.F. und LAMOND, D.R.
(1973)

Plasma hormone levels in beef cows with
induced multiple ovulations

J. Reprod. Fert. 35 : 225

HOPPE, P.C. und PITTS, S. (1973)

Fertilization in vitro and development of mouse
ova

Biol. Reprod. 8 : 420

HUNTER, R.H.F. (1966)

The effect of superovulation on fertilization
and embryonic survival in the pig

Anim. Prod. 8 : 457

HUNTER, R.H. F. (1968)

Polyspermic fertilization in pigs during the
luteal phase of the estrous cycle

J. exp. Zool. 165 : 451

JAINUDEEN, M.R., HAFEZ, E.S.E. und LINEWEAVER, J.A. (1966)

Antigonadotropins in the serum of cows following
repeated therapeutic pregnant mare serum injection

Am. J. Vet. Res. 27 : 675

- KANE, M.T. und FOOTE, R.H. (1970)
Culture of two- and four-cell rabbit embryos to the
expanding blastocyst stage in synthetic media
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 133 : 921
- KENELLY, J.J. und FOOTE, R.H. (1965)
Superovulatory response of pre- and post pubertal
rabbits to commercially available gonadotrophins
J. Reprod. Fert. 9 : 177
- KUHN, A. (1974)
Tiefgefrierkonservierung befruchteter Mäuseeizellen
Vet. med. Diss., München
- LIN, T.P. und BAILEY, D.W. (1965)
Difference between two inbred strains of mice in
ovulatory response to repeated administration of
gonadotrophins
J. Reprod. Fert. 10 : 253
- LONGO, F.J. (1974)
Ultrastructural changes in rabbit eggs aged
in vivo
Biol. reprod. 11 : 22
- MAURER, R.R., HUNT, W.L. und FOOTE, R.H. (1968 a)
Repeated superovulation following administration
of exogenous gonadotrophins in dutch-belted rabbits
J. Reprod. Fert. 15 : 93
- MAURER, R.R., HUNT, W.L., VAN VLECK und FOOTE, R.H. (1968 b)
Developmental potential of superovulated rabbit ova
J. Reprod. Fert. 15 : 171

- MAURER, R.R., STRANZINGER, G.F. und PAUFLER, S.K. (1976)
Embryonic development in rabbits after insemination with spermatozoa stored at 37, 5, or - 196°C for various periods
J. Reprod. Fert. 48 : 43
- McCLELLAN, M.C., DIEKMANN, M.A., ABEL, J.H. und NISWENDER, G.D. (1975)
Luteinizing hormone, progesteron and the morphological development of normal and superovulated Corpora lutea in sheep
Cell Tiss. Res. 164 : 291
- MCGAUGH, J.W., OLDS, D. und KRATZER, D.D. (1974)
Ovum recovery in superovulated cows and cleavage rates in the fertilized ova
Theriogenology 1 : 213
- McLAREN, A. und MICHIE, D. (1959)
Superpregnancy in the mouse I. Implantation and foetal mortality after induced superovulation in females of various ages
J. exp. Biol. 36 : 281
- McLAREN, A. und ORSINI, M.W. (1968)
The fate of unfertilized eggs in mice
J. Reprod. Fert. 15 : 181
- MERK, F.B., ALBRIGHT, J.T. und BOTTICELLI, C.R. (1973)
The fine structure of granulosa cell nexus in rat ovarian follicles
Anat. Rec. 175 : 107

- MIYAMOTO, H. und CHANG, M.C. (1973)
Fertilization of rat eggs in vitro
Biol. Reprod. 9 : 384
- MOORE, N.W. und ROWSON, L.E.A. (1960)
Egg transfer in sheep: factors affecting
the survival and development of transferred
eggs
J. Reprod. Fert. 1 : 332
- MOORE, P.J. und GREENWALD, G.W. (1974)
Seasonal variation in ovarian responsiveness of
the cyclin hamster to PMSG
J.Reprod. Fert. 36 : 219
- MUDRA, A. (1958)
Statistische Methoden für landwirtschaftliche
Versuche
Paul Parey, Berlin und Hamburg
- NIWA, K. und CHANG, M.C. (1973)
Fertilization in vitro of rat eggs as affected
by the maturity of the females and the sperm
concentration
J. Reprod. Fert. 35 : 577
- ODOR, D.L. (1955)
The temporal relationship of the first maturation
of rat ova to onset of heat
Am. J. Anat. 97 : 461
- ONUMA, H., MAURER, R.R. und FOOTE, R.H. (1968)
In-vitro culture of rabbit ova from early
cleavage stages to the blastocyst stage
J. Reprod. Fert. 16 : 491

- PAUFLEDER, S., MAURER, R. und GELDERMANN, G. (1975)
Untersuchungen chromosomaler Aberrationen an
Blastocysten von superovulierten Kaninchen
nach bis zu 5-tägiger Lagerung des zur Besamung
verwendeten Spermas bei verschiedenen Tempera-
turen
Zbl. Vet. Med. A 22 : 414
- PERKINS, J.L. und GOODE, L. (1966)
Effects of stage of the oestrous cycle and
exogenous hormones upon the volume and composi-
tion of oviduct fluid in ewes
J. Anim. Sci. 25 : 465
- PERKINS, J.L. und GOODE, L. (1967)
Free amino acids in the oviduct fluid of the
ewe
J. Reprod. Fert. 14 : 309
- POLIDORO, J.P. und BLACK, D.L. (1970)
Peripheral plasma progesterone and the number
of fetuses in normal and superovulated rabbits
J. Reprod. Fert. 22 : 493
- ROTTMANN, O. und STRANZINGER, G. (1977)
Ergebnisse der Superovulation beim Kaninchen
durch einmalige PMSG-Applikation bei zwei Zucht-
linien
Zuchthygiene 12 : 14
- SAUMANDE, J. und CHUPIN, D. (1977)
Superovulation: a limit to egg transfer in cattle
Theriogenology 7 : 141
- SCANLON, R., SREENAN, J. und GORDON, I. (1968)
Hormonal induction of superovulation in cattle
J. agricult. Sci. 70 : 179

- SCHUETZ, A.W. (1974)
Role of hormones in oocyte maturation
Biol. Reprod. 10 : 150
- SPALDING, J.F., BERRY, R.O. und MOFFIT, J.G. (1955)
The maturation process of the ovum of swine
during normal and induced ovulations
J. Anim. Sci. 14 : 609
- SPINDLE, A.I. und GOLDSTEIN, L.S. (1975)
Induced ovulations in mature mice and develop-
ment capacity of the embryos
J. Reprod. Fert. 44 : 113
- TSUNODA, Y. und SUGIE, T. (1977)
Survival of rabbit eggs preserved in plastic
straws in liquid nitrogen
J. Reprod. Fert. 49 : 173
- VARIAN, N.B., MAURER, R.R. und FOOTE, R.H. (1967)
Ovarian response and cleavage rate of ova in
control and FSH-primed rabbits receiving varying
levels of luteinizing hormones
J.Reprod. Fert. 13 : 67
- WEBEL, S.K., REIMERS, P.J. und DZIUK, P.J. (1975)
The lack of relationship between plasma progester-
one levels and number of embryos and their
survival in the pig
Biol. Reprod. 13 : 177
- WEBER, E. (1972)
Grundriß der biologischen Statistik
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

- WHITTEN, W.K. und BIGGERS, J.D. (1968)
Complete development in vitro of the preimplan-
tation stages of the mouse in a simple chemically
defined medium
J. Reprod. Fert. 17 : 399
- WHITTINGHAM, D.G. (1971)
Survival of mouse embryos after freezing and thawing
Nature (London) 233 : 125
- WHITTINGHAM, D.G. (1975)
Survival of rat embryos after freezing and
thawing
J. Reprod. Fert. 43 : 575
- WILDT, D.E., WOODY, A.D. und DUKELOW, W.R. (1975)
Induction of multiple ovulation in the cow
with single injections of FSH and HCG
J. Reprod. Fert. 44 : 583
- WILLADSEN, S.M. POLGE, C., ROWSON, L.E.A. und MOOR, R.M.
(1976)
Deep freezing of sheep embryos
J. Reprod. Fert. 46 : 151
- WILLET, E.L., BUCKNER, P.J. und McSHAN, W.H. (1953)
Refractoriness of cows repeatedly superovula-
ted with gonadotrophins
J. Dairy Sci. 36 : 1083
- WILMUT, I. und ROWSON, L.E.A. (1973)
The successful low-temperature preservation of
mouse and cow embryos
J. Reprod. Fert. 33 : 352 abstr. only

LEBENS LAUF

Am 18.6.1951 wurde ich als 2. Kind der Eheleute Georg und Elisabeth Braun, geb. Dirscherl, in Schwarzenfeld/Oberpfalz geboren. Von 1957 bis 1961 besuchte ich dort die Volksschule und trat dann in das Gymnasium Schwandorf/Bayern über.

Nach bestandener Reifeprüfung im Jahr 1970 begann ich im Wintersemester 1970/71 mit dem Studium der Tiermedizin am Tierärztlichen Fachbereich der Universität München.

Das Studium beendete ich erfolgreich im Herbst 1975. Seit dem 1. Februar 1976 war ich mit der Anfertigung vorliegender Arbeit beschäftigt.

Herrn Professor Dr. W. Leidl möchte ich für die Überlassung des Themas und für jederzeit gewährte Unterstützung sehr herzlich danken.

Zu großem Dank bin ich den Angehörigen des Lehrstuhls verpflichtet, insbesondere Herrn Dr. W. Schefels für viele Ratschläge bei den Versuchen zur Tiefgefrierkonservierung.

Besonders danken möchte ich auch meiner Kollegin, Frl. G. Stidl, für die Hilfe bei den Operationen.

